Maria DRONCA

ENZIME

COFACTORI ENZIMATICI

Note de curs

Editura Medicală Universitară "Iuliu Haţieganu"
Cluj-Napoca 2002

III 269.142

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAȘI
III 269.142

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

139

MARIA DRONCA

299003

ENZIME
COFACTORI ENZIMATICI

Note de curs

342904
B.C.U. IASI

EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ "IULIU HAŢIEGANU"
CLUJ-NAPOCA 2002

ALE

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

J77.15/16

© EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ "IULIU HAŢIEGANU" CLUJ-NAPOCA

Maria Dronca

Enzime. Cofactori enzimatici. (note de curs)

ISBN 973-8019-91-5

Toate drepturile acestei ediţii sunt rezervate Editurii Medicale Universitare "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca. Tipărit în România. Nici o parte din această lucrare nu poate fi reprodusă sub nici o formă, prin nici un mijloc mecanic sau electronic, sau stocată într-o bază de date, fără acordul prealabil, în scris, al editurii.

Copyright © 2002
EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ "IULIU HAŢIEGANU" CLUJ-NAPOCA

Enzime
Vitamine
Cofactori enzimatici

EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ "IULIU HAŢIEGANU" CLUJ-NAPOCA
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE "IULIU HAŢIEGANU" CLUJ-NAPOCA
3400 Cluj-Napoca, 13, Emil Isac str. ☎: +40-64-197256; fax:+40-64-196585

Director: Prof. Dr. Liviu Vlad

Tiparul executat la Tipografia Universităţii de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca, str. Moţilor 33, ☎ + 40-64-198701

PRINTED IN ROMÂNIA

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

25. SEP. 2002

Cuvânt înainte

Un organism viu este un ansamblu magnific de reacţii chimice. Multe dintre reacţii au loc cu viteze semnificative deoarece sunt catalizate de proteine specifice numite enzime. Acestea au rolul de a controla atât tipul cât şi vitezele reacţiilor care se desfăşoară la un moment dat, în organismele vii. Cu alte cuvinte, enzimele asigură armonia complexă a transformărilor chimice din organism.

Ca şi alte proteine enzimele sunt formate din aminoacizi, şi au o structură tridimensională ce corespunde conformaţiei cu energie minimă. Deci este normal să ne întrebăm de ce unele proteine acţionează ca şi catalizatori mai eficienţi decât cei clasici, în timp ce altele care conţin aceaşi aminoacizi nu au această capacitate? Mai mult, ar trebui să căutăm explicaţia faptului că enzimele catalizează numai anumite reacţii, şi capacitatea lor catalitică este reglabilă.

Pentru multe enzime funcţia catalitică este dependentă de prezenţa cofactorului care, în majoritatea cazurilor, este derivatul unei vitamine hidrosolubile. De aceea am considerat că este utilă prezentarea cofactorilor şi a vitaminelor alături de enzime.

Existente în toate organismele vii, enzimele apar frecvent în sânge. Unele enzime, ca de exemplu cele implicate în coagularea sângelui, sunt prezente în mod normal în cantitate mare. Altele apar în sânge numai ca urmare a distrugerilor tisulare şi/sau celulare. De aceea determinarea activităţii enzimelor serice poate fi utilă pentru confirmarea diagnosticului unei anumite boli sau anormalităţi fiziologice. Dată fiind importanţa acestora în pregătirea viitorilor medici ne-am propus ca pe lângă aspectele legate de structura, nomenclatura, proprietăţile generale,

cinetica şi mecanismul de acţiune al enzimelor să prezentăm şi principalele aspecte legate de importanţa clinică a acestora.

Autoarea speră că în pofida unor imperfecţiuni, fără îndoială existente, manualul va servi atât studenţilor medicinişti cât şi absolvenţilor.

Informaţiile prezentate suportă completări care pot fi găsite în vasta bibliografie existentă în domeniu, din care recomandăm:

- Biological Chemistry, 1971 - HR Mahler, EH Corders;
- Biochimie generale et medicale (vol. 3), 1980 - P Louisot
- Biochimie (vol.1), traducere după Biochemistry, 1987 - AL Lehninger;
- Harper's Biochemistry, 1988 - RK Murray, DK Granner, PA Mayes, VW Rodwell;
- Clinical Chemistry, 1991 – ML Bishop, JL Duben-Engelkirk, EP Fody
- Biochemistry, 1993 - G Zubay;
- Basic Medical Biochemistry, 1996 – DB Marks, AD Marks, CM Smith;
- Textbook of Biochemistry with clinical correlations, 1997 – TM Devlin.

Şef lucr.Dr. Maria Dronca
Catedra de Biochimie Medicală
UMF "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Pag

Partea I-a. Enzime

Energetica şi cinetica reacţiilor chimice..... 1
Viteza de reacţie 1
Viteza iniţială de reacţie 2
Legea acţiunii maselor aplicată echilibrelor chimice. 4
Constanta de echilibru
Relaţia dintre constanta de viteză şi energia moleculelor 5
Teoria ciocnirilor moleculare. Energia de activare 5
Entalpia de reacţie 6
Entalpia liberă de reacţie 7
Teoria stării de tranziţie sau teoria complexului activat 8
Proprietăţile generale ale catlizatorilor 13
Caracterizarea enzimelor..... 14
Caracterizare din punct de vedere al rolului biologic 14
Caracterizare din punct de vedere structural 17
Caracterizarea apoenzimei 17
Caracterizarea cofactorului enzimatic 18
Centrul activ..... 19
Definiţie 19
Dovezi experimentale ale existenţei centrului activ 19
Caracterizarea centrului activ 20
Specificitatea enzimelor..... 22
Specificitatea de reacţie 22
Specificitatea pentru substrat 23
Stereospecificitatea 24
Clasificarea şi nomenclatura enzimelor..... 26
Clasificarea enzimelor 26
Nomenclatura enzimelor 33
Mecanismul catalizei enzimatice..... 34
Modalităţi prin care enzimele măresc viteza reacţiilor 34
Efectul de apropiere şi orientare a substratelor 34
Efectul deadaptare sterică a centrului activ 34
Efectul de distorsionare a substratului 35
Efectul de favorizare a interacţiunilor electrostatice 35
Cataliza acido-bazică 36
Cataliza covalentă 37

BCU CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Mecanismul de acţiune a serin proteazelor 39
Mecanismul de acţiune a lizozimului 44
Mecanismul de acţiune a carboxipeptidazelor 47
Cinetica reacţiilor enzimatice..... 49
Viteza iniţială 49
Influenţa concentraţiei enzimei asupra vitezei iniţiale 50
Influenţa concentraţiei substratului asupra vitezei iniţiale 52
Deducerea ecuaţiei Michaelis-Menten 53
Semnificaţia K_M 55
Determinarea experimentală a parametrilor cinetici 56
"Turn-over number". Constanta de specificitate 56
Factorii care influenţează viteza reacţiilor enzimatice..... 58
Influenţa temperaturii 58
Influenţa pH-ului 59
Influenţa inhibitorilor ireversibili 60
Influenţa inhibitorilor reversibili 62
Inhibiţia competitivă
Inhibiţia necompetitivă
Inhibiţia uncompetitivă
Enzime allosterice..... 69
Definiţie din punct de vedere al rolului biologic 69
Definiţie din punct de vedere structural 69
Caracterizare structurală şi funcţională 70
Efectul concentraţiei substratului. Relaţia lui Hill. 72
Efectul activatorilor şi inhibitorilor 75
Alte modalităţi de reglare 77
Interacţiunea cu alte proteine 77
Modificarea covalentă reversibilă 78
Izoenzime..... 81
Definiţie 81
Cauzele apariţiei 82
Distribuţia 83
Activitatea enzimatică..... 84
Definiţie 84
Unităţi de măsură 85
Determinarea activităţii 85
Reglarea vitezei reacţiilor enzimatice..... 87
Controlul concentraţiei enzimelor 87

Controlul activităţii enzimelor reglatoare 89
Controlul concentraţiei substratului 89
Acţiunea efectorilor allosterici 89
Modificarea covalentă ireversibilă 90
Modificarea covalentă reversibilă 94
Aplicaţii clinice ale enzimelor..... 95
Utilizarea enzimelor pentru diagnostic 95
Utilizarea enzimelor ca reactivi 97
Utilizarea enzimelor ca medicamente 99

Partea II-a. Cofactori enzimatici
Definiţie. Clasificare..... 100
Cofactori anorganici..... 101
Caracteristici 101
Rol biologic 103
Patologie asociată 107
Cofactori organici. Coenzime & Grupări prostetice..... 109
Caracteristici comune 109
Clasificare 109
Caracteristici specifice coenzimelor 109
Caracteristici specifice grupărilor prostetice 111
Clasificare funcţie de tipul reacţiei la care participă 112
Cofactori implicaţi în reacţii de oxido-reducere..... 114
Cofactori implicaţi în transfer de electroni (e^-) 114
Hem 114
Enzime heminice 116
Cofactori implicaţi în transferul de ($e^- + H^+$) 125
NAD^+ şi $NADP^+$ 126
Enzime nicotinice 128
FMN şi FAD 129
Enzime flavinice 131
Tetrahidrobiopterina (H_4B) 132
Enzime H_4B-dependente 133
Enzime dependente de acidul lipoic 134
Acidul ascorbic 135
Enzime dependente de acidul ascorbic 136
Coenzima Q (CoQ) 137
Enzime CoQ-dependente 138

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina K 138
Enzime vitamin K-dependente 139
Cofactori implicaţi în transferul unor grupări..... 143
Cofactori implicaţi în transferul grupărilor fosfat, pirofosfat 143
Nucleotide trifosforilate: ATP 143
Enzime dependente de ATP 144
Alte nucleotide trifosforilate: CTP, UTP,GTP 146
Enzime dependente de CTP, UTP, GTP 147
Cofactori implicaţi în transferul grupării sulfat 149
Fosfo adenozin fosfo sulfat (PAPS) 149
Enzime PAPS-dependente 150
Cofactori implicaţi în transferul grupării amino 151
Piridoxal fosfat (PALPO) 151
Enzime PALPO-dependente 152
Cofactori implicaţi în transferul unor grupări care conţin un singur atom de C 154
S-Adenozil metionina (SAM) 154
Enzime SAM-dependente 155
Biotina 156
Enzime biotin-dependente 157
Tetrahidro folat (H_4F) 158
Enzime H_4F-dependente 160
Metil-cobalamina (CH_3-B_{12}) 160
Enzime CH_3-B_{12}-dependente 161
Cofactori implicaţi în transferul unor grupări care conţin mai mulţi atomi de C 163
Fosfopanteteina 163
Enzime dependente de fosfopanteină 164
Coenzima A (CoA) 164
Enzime CoA-dependente 166
Cofactori implicaţi în clivarea legăturilor C-C şi C-X..... 168
Tiamin Pirofosfat (TPP) 168
Enzime TPP-dependente 169
Cofactori implicaţi în reacţii de rearanjare a substituenţilor atomilor de carbon adiacenţi..... 171
Deoxiadenozil cobalamina 171
Enzime dependente de deoxiadenozil cobalamină 172
Analogi ai cofactorilor organici utilizaţi ca medicamente. 174

Partea III-a. Vitamine..... 176
Definiţie 176
Caracteristici comune 177
Clasificare 177
Vitamine hidrosolubile..... 179
Caracteristici generale 179
Clasificare & Rol biologic 180
Semnificaţii clinice 182
Vitamine liposolubile..... 186
Caracteristici generale 188
Vitamina A 189
Vitamina E 196

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Partea I-a

ENZIME

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ENERGETICA ŞI CINETICA REACŢIILOR CHIMICE

Viteza de reacţie

Viteza unei reacţii chimice reprezintă variaţia concentraţiei în unitatea de timp, respectiv dc/dt, şi se exprimă în moli/sec (minute, sau ore). Viteza se poate calcula pe baza relaţiei:

$$v = -\frac{d[reac\tan t]}{dt} = \frac{d[produs]}{dt} = k \times [reac\tan t] \qquad (1.1)$$

unde k=constanta de viteză, respectiv viteza la concentraţii unitare ale reactanţilor, sau produşilor de reacţie; se măsoară în condiţii standard de temperatură, presiune, pH, şi permite compararea vitezelor diferitelor reacţii.

Precizăm faptul că în intervalul de timp $dt=t_2-t_1$, expresia dc/dt corespunde vitezei medii. Viteza la momentul t_1 este de fapt limita lui dc/dt şi corespunde tangentei, în acest punct, la curba c=f(t) (fig. 1.1).

În cazul unei reacţii cu doi reactanţi, de tipul :

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

viteza este dată de relaţia:

$$v = k[A][B] \qquad (1.2)$$

şi corespunde unei cinetici de ordinul 2. În cazul în care unul dintre reactanţi este în exces (de exemplu H_2O, în cazul reacţiilor de hidroliză) ordinul de reacţie se reduce la 1, deoarece concentraţia acestuia este practic constantă în cursul reacţiei.

În cazul în care toţi reactanţii sunt în exces, viteza nu va depinde de concentraţia acestora, deci va fi constantă, şi ordinul de reacţie va fi zero.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

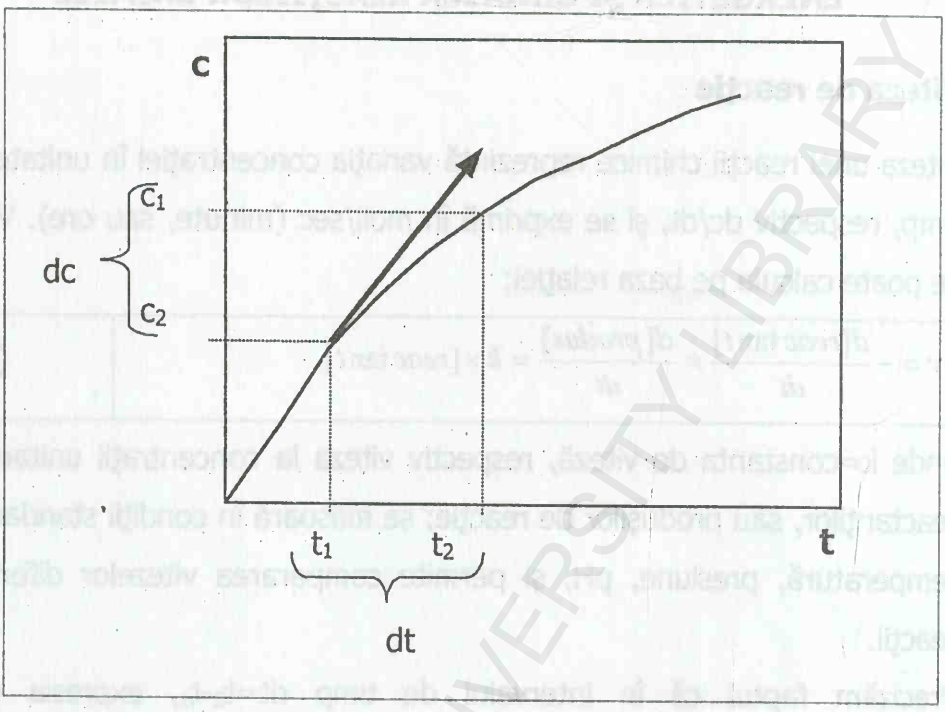


FIGURA 1.1.
Viteza de reacţie

Viteza iniţială de reacţie

Considerând o reacţie de echilibru de tipul:

$$S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P$$

cu o cinetică de ordinul 1, viteza de dispariţie a compusului S este dată de relaţia :

$$v_1 = k_1[S] \qquad (1.3)$$

iar viteza de formare a compusului P este dată de relaţia:

$$v_2 = k_2[P] \qquad (1.4)$$

BCU "ASICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Viteza efectivă (v) de transformare a compusului S sau de formare a compusului P va fi dată de diferenţa celor două viteze:

$v = v_1 - v_2$	(1.5)

Evoluţia reacţiei de la stânga spre dreapta presupune micşorarea concentraţiei compusului S, deci şi a vitezei v_1, respectiv creşterea concentraţiei compusului P, deci şi a vitezei v_2. Cu alte cuvinte, $v=v_1-v_2$ se va micşora în timp. Prin reprezentarea grafică a concentraţiei compusului S în funcţie de timp se obţine o curbă exponenţială de tipul celei din figura 1.2. Viteza la un moment dat (t) va fi dată de panta tangentei la curbă, dusă din punctul corespunzător lui t.. La momentul zero, viteza este maximă şi reprezintă viteza iniţială a reacţiei. La momentul t , viteza este mai mică datorită reacţiei în sens invers.

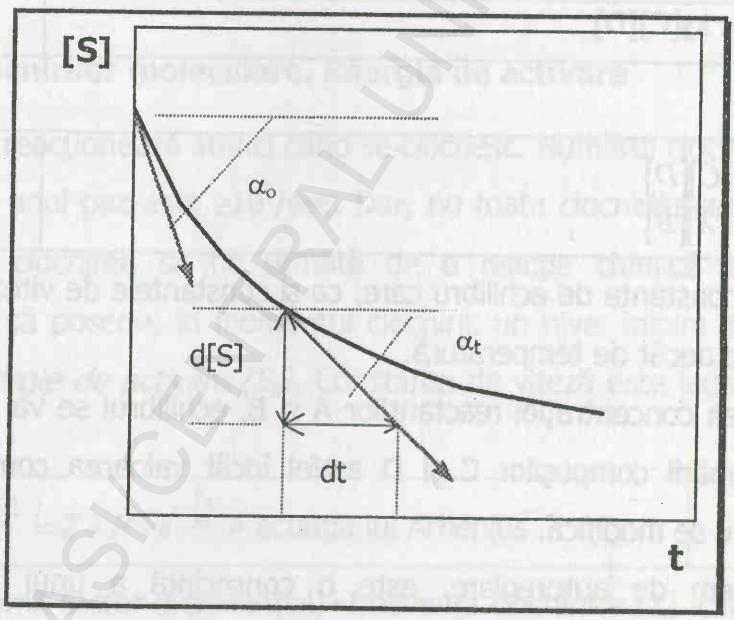


FIGURA 1.2.
Variaţia vitezei de reacţie în timp

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Legea acţiunii maselor aplicată echilibrelor chimice. Constanta de echilibru

Un mare număr de reacţii care au loc în organismele vii evoluează spontan dar sunt limitate de reacţia în sens invers, cu alte cuvinte sunt reacţii reversibile de tipul:

$$A + B \underset{v_2}{\overset{v_1}{\rightleftharpoons}} C + D$$

În acest caz vitezele reacţiilor opuse sunt date de expresiile:

$v_1 = k_1[A][B]; \qquad v_2 = k_2[C][D]$	(1.6)

La echilibru:

$v_1 = v_2$	(1.7)

Ca urmare,

$k_1[A][B] = k_2[C][D]$	(1.8)

respectiv:

$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$	(1.9)

unde K = constanta de echilibru care, ca şi constantele de viteză k_1 şi k_2, nu depinde decât de temperatură.

La creşterea concentraţiei reactanţilor A şi B, echilibrul se va deplasa în sensul formării compuşilor C şi D astfel încât valoarea constantei de echilibru nu se modifică.

Acest sistem de autoreglare, este o consecinţă a unui principiului fundamental, stabilit de Le Chatelier, conform căruia orice modificare a unuia dintre factorii unui echilibru va determina o variaţie de sens contrar, astfel încât valoarea constantei de echilibru să nu se modifice.

BCU ASCETRAL UNIVERSITY LIBRARY

Relaţia dintre constanta de viteză k şi energia moleculelor

Energia unei molecule (E) reprezintă suma energiei potenţiale V (rezultat al interacţiunilor, de natură electrostatică, a atomilor moleculei) şi a energiei cinetice Ec . Pentru gazele ideale:

$E = V + Ec = V + \frac{3}{2} \times k \times T = V + \frac{3}{2} \times \frac{R}{N} \times T$	(1.10)

unde k=constanta Boltzman.

Prin creşterea temperaturii, creşte energia cinetică. În momentul cioncnirii a 2 molecule Ec=0 şi E=V; energia potenţială se va distribui de-a lungul legăturilor chimice din moleculă, sub formă de energie de vibraţie, rotaţie etc. Când o legătură dobândeşte o energie egală cu energia de disociere are loc ruperea ei, deci are loc o transformare chimică.

Teoria ciocnirilor moleculare. Energia de activare

Moleculele reacţionează atunci când se ciocnesc. Numărul ciocnirilor între moleculele unui gaz este $\cong 10^9$/sec. Dar, nu toate ciocnirile sunt eficace. Pentru ca ciocnirea să fie urmată de o reacţie chimică trebuie ca moleculele să posede, în momentul ciocnirii, un nivel minim de energie numită *energie de activare (E_a)*. Constanta de viteză este legată E_a prin relaţia:

$k = A \times e^{-\frac{E_a}{RT}} = Z \times P \times e^{-\frac{E_a}{RT}}$ = ecuaţia lui Arhenius	(1.11)

unde A (numit factor exponenţial)=frecvenţa ciocnirilor (Z) x factorul de probabilitate (P) care exprimă necesitatea unei orientări adecvate în momentul ciocnirii.

BCU "SICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Variaţia energiei în timpul unei reacţii chimice este ilustrată de diagrama din figura 1.3, obţinută prin reprezentarea grafică a variaţiei energiei potenţiale în funcţie de timp (coordonata de reacţie):

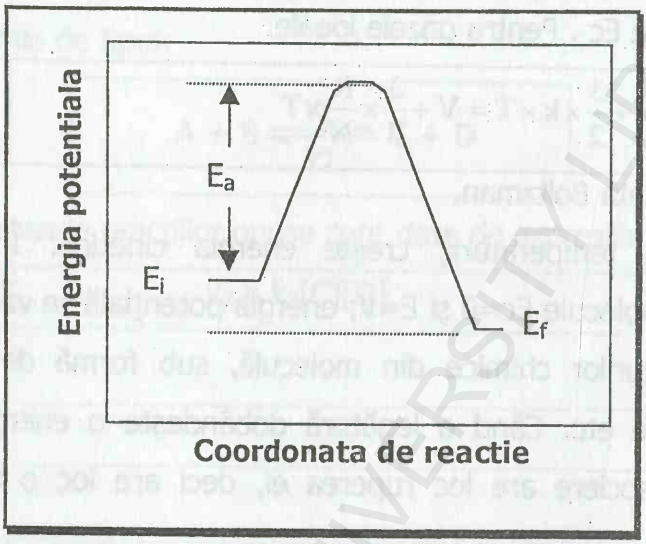


FIGURA 1.3.
Variaţia energiei potenţiale în timpul unei reacţii chimice

Entalpia de reacţie

Entalpia de reacţie ΔH, sau căldura de reacţie, reprezintă cantitatea de căldură absorbită sau eliberată în cursul unei reacţii chimice (prin care reactanţii se transformă în produşi):

$\Delta H = H_{final} - H_{iniţial}$ = Entalpia stării finale – Entalpia stării iniţiale	(1.12)

ΔH nu depinde de mecanismul reacţiei, de calea de transformare a reactanţilor, ci depinde numai de starea energetică a compuşilor iniţiali şi finali. Reacţia este:

- endotermă, dacă $\Delta H > 0$;
- exotermă, dacă $\Delta H < 0$.

BCU "ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Entalpia liberă de reacţie

Entalpia liberă de reacţie ΔG este aceea parte a variaţiei totale a entalpiei (ΔH) unui sistem care poate fi utilizată efectiv pentru producerea unui lucru chimic (transfer de electroni, ruperi sau formări de legături). Cu alte cuvinte reprezintă "motorul reacţiei". Se calculează pe baza relaţiei:

$$\Delta G = G_f - G_i = \Delta H - T\Delta S \qquad (1.13)$$

Dacă se măsoară în condiţii standard (25 ^{0}C; 1 at), $\Delta G = \Delta G^0$ = entalpia liberă standard numită şi energie liberă standard.

Valoarea energiei libere standard dă informaţii privind probabilitatea desfăşurării reacţiei. O valoare:

- $\Delta G^0 < 0$ corespunde unei reacţii posibile;
- $\Delta G^0 < 10$ kcal/mol corespunde unei reacţii probabile, posibilă doar în anumite condiţii;
- $\Delta G^0 > 10$ kcal/mol corespunde unei reacţii imposibile.

Entalpia liberă este rezultatul a 2 termeni antagonişti: ΔH (care poate avea semnul – sau +) şi ΔS. La temperatură joasă, termenul $T\Delta S$ este neglijabil. Ca urmare, sunt favorizate reacţiile exoterme ($\Delta H<0$). La temperatură ridicată, termenul $T\Delta S$ capătă pondere. Ca urmare, ΔG va deveni negativ chiar dacă $\Delta H>0$, deci la temperaturi mari şi reacţiile endoterme sunt posibile.

În cazul reacţiilor reversibile, variaţia entalpiei libere se poate calcula pe baza relaţiei:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT\ln K \qquad (1.14)$$

unde K este constanta de echilibru a reacţiei.

Dacă $\Delta G = 0$, atunci:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$\Delta G^0 = -RT\ln K = -2,3RT\log K.$	(1.15)

Cunoscând valoarea constantei se poate aprecia dacă reacţia este de echilibru, este o reacţie posibilă sau este o recţie imposibilă:

$K = 1;\ \Delta G^0 = 0$; reacţie de echilibru $K > 1;\ \Delta G^0 < 0$; reacţie posibilă $K < 1;\ \Delta G^0 > 0$; reacţie imposibilă	(1.16)

Teoria stării de tranziţie sau teoria complexului activat

Pentru ca o reacţie de tipul:

A + B-C = A-B + C

să aibe loc, trebuie ca moleculele compusului A să se ciocnească, într-o orientare adecvată, cu moleculele compusului B-C şi, în momentul ciocnirii, să aibe o energie egală cu aceea a energiei de activare. Ca urmare a ciocnirii eficace se formează tranzitoriu un complex activat în care legătura B-C este în curs de rupere iar legătura A-B este în curs de formare (vezi fig 1.4).

Variaţia energiei libere corespunzătoare formării complexului activat $[A\bullet\bullet\bullet B\bullet\bullet\bullet C]^{\#}$ este dată de relaţia:

$\Delta G^{\#} = \Delta H^{\#} - T\Delta S^{\#}$	(1.17)

unde $\Delta G^{\#}$,$\Delta H^{\#}$ şi $\Delta S^{\#}$ reprezintă entalpia de activare, entalpia liberă de activare, respectiv entropia de activare.

În cazul moleculelor flexibile, cu grade mari de libertate de mişcare, pentru care $\Delta S^{\#} >> 0$ este favorizată formarea stării de tranziţie, reacţia are loc uşor şi cu viteză mare.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cazul moleculelor rigide, a căror structură impune o anumită orientare a reactanţilor, $\Delta S^{\#}$ are valori prea mici sau este negativă, ca urmare reacţia decurge cu viteză mică.

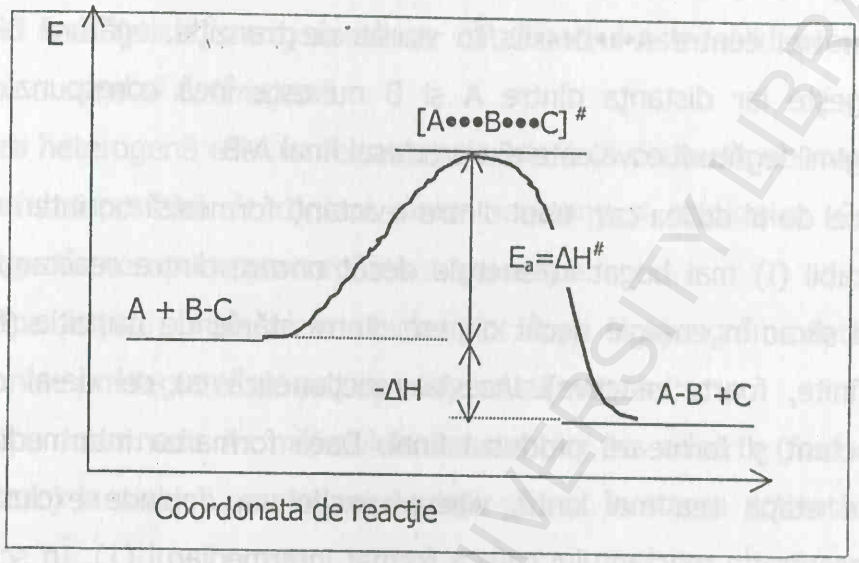


FIGURA 1.4.
Variaţia energiei în timpul unei reacţii chimice

Entropiei de activare îi coresponde factorul de probabilitate P din ecuaţia lui Arhenius (1.11).

Transformarea reactanţilor în produşi de reacţie poate decurge:

a) printr-o singură stare de tranziţie:

$$A + B\text{-}C \rightleftharpoons [A\text{---}B\text{---}C]^{*} \rightleftharpoons A\text{-}B + C$$

b) prin două stări de tranziţie şi un intermediar:

c)

Reactanţi ⇔ [Stare de tranziţie]$_I^{\#}$ ⇔ Intermediar ⇔ [Stare de tranziţie]$_{II}^{\#}$ → Produşi

✓ În primul caz, energia care rezultă prin ruperea legăturii vechi se utilizează la formarea noii legături. La apropierea moleculelor A de

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

moleculele B-C energia potenţială a moleculei B-C se măreşte datorită repulsiei existente între moleculele cu legături covalente saturate. Pentru ca A să se poată apropia de B-C este nevoie de un surplus de energie (Ea). Cel mai mic consum energetic corespunde coliniarităţii celor trei centre A•••B•••C. În starea de tranziţie legătura B-C se lungeşte iar distanţa dintre A şi B nu este încă corespunzătoare lungimii legăturii covalente din produsul final A-B.

✓ În cel de-al doilea caz, unul dintre reactanţi formează un intermediar instabil (I) mai bogat în energie decât oricare dintre reactanţi, dar mai sărac în energie decât oricare dintre stările de tranziţie (forme definite, foarte reactive). Acesta reacţionează cu cel de-al doilea reactant şi formează produsul final. Dacă formarea intermediarului este etapa cea mai lentă, viteza reacţiei va depinde exclusiv de concentraţia reactantului care a format intermediarul (1). În schimb, în cazul în care descompunerea intermediarului este etapa cea mai lentă, viteza reacţiei va depinde de concentraţia ambilor reactanţi (2):

(1) $A \xrightarrow{\text{lent}} I;\ I + B \xrightarrow{\text{rapid}} A\text{-}B;\ v = k_1[A]$

(2) $A \xrightarrow{\text{rapid}} I;\ I + B \xrightarrow{\text{lent}} A\text{-}B;\ v = k_2[A][B]$

Acest caz corespunde reacţiilor catalizate, caz în care catalizatorul formează rapid cu unul dintre reactanţi un intermediar instabil, mai reactiv, care apoi reacţionează cu celălalt reactant şi formează produsul final. Intermediarii formaţi pot fi radicali (molecule care conţin atomi de carbon cu orbitali monoelectronici), carbocationi (molecule care conţin atomi de carbon cu sarcină pozitivă şi geometrie plană, respectiv atom de C cu orbital p nehibridizat fără electroni), sau carboanioni (molecule care conţin atomi de carbon cu

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sarcină negativă, cu geometrie tetragonală, respectiv atomi de C care are orbital hibridizat ocupat cu 2 electroni).

Dacă catalizatorul şi reactanţii formează un sistem omogen (lichid sau gazos), avem de-a face cu o *cataliză omogenă*. În cazul în care reactanţii sunt în fază lichidă sau gazoasă iar catalizatorul este solid avem de-a face cu o *cataliză heterogenă*.

Cataliza heterogenă este un fenomen de interfaţă deoarece se manifestă la nivelul suprafeţei de contact dintre reactanţi şi catalizator. Cataliza heterogenă presupune parcurgerea a trei etape:

1. Etapa iniţială: moleculele reactanţilor A şi B ajung în contact cu "zonele privilegiate" de pe suprafaţa catalizatorului;
2. Etapa intermediară: moleculele reactanţilor se adsorb (fizic şi/sau chimic) la nivelul zonelor privilegiate şi trec în starea activată A* şi B*;
3. Etapa finală: are loc formarea, desorbţia şi eliberarea în mediu a produsului de reacţie AB; catalizatorul se regăseşte intact la sfârşitul reacţiei.

În cazul reacţiilor chimice din organismele vii catalizatorii sunt enzime. În pofida faptului că enzimele şi reactanţii formează o singură fază (lichidă) biocataliza decurge prin etape similare catalizei heterogene. Zonele privilegiate ale catalizatorului corespund centrului activ al enzimei, iar reactanţii (A, B) sunt substratele (S_1, S_2) enzimei. Prin adsorbţia substratelor la centrul activ al enzimei rezultă complexul activ enzimă-substrat (ES).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proprietăţile generale ale catalizatorilor

- Catalizatorii sunt substanţe care reduc energia de activare şi consecutiv măresc numărul ciocnirilor eficace dintre reactanţi, deci măresc viteza de reacţie (fig. 1.5);

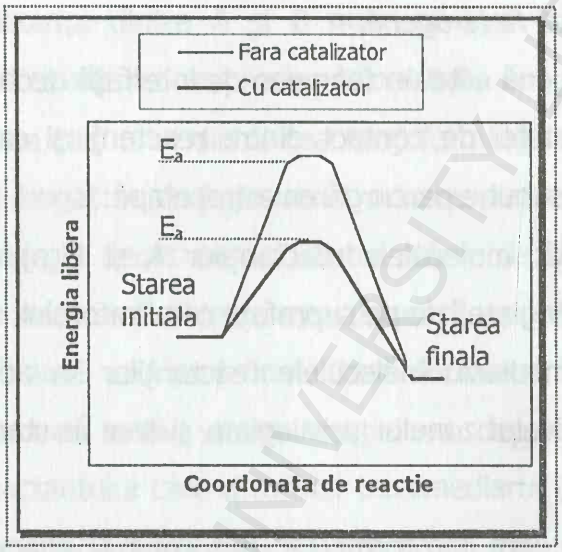


FIGURA 1.5.
Variaţia energiei libere pentru reacţia catalizată, comparativ cu variaţia energiei libere pentru reacţia necatalizată

- În cazul reacţiilor reversibile catalizatorii măresc, în aceaşi măsură, viteza reacţiilor de sens contrar, deci contribuie la creşterea vitezei de atingere a echilibrului fără a modifica poziţia lui.

De exemplu, în cazul interconversiei:

$$A \rightleftharpoons B$$

Presupunând că, în absenţa catalizatorului, viteza în sensul A→B are $k_1=10^{-4}$sec, şi în sensul B→A are $k_2=10^{-6}$sec, constanta de echilibru va fi:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

În prezenţa catalizatorului constantele de viteză cresc în aceaşi măsură: $k_1=10^{-8}$sec şi $k_2=10^{-10}$sec. Ca urmare valoarea constantei de echilibru rămâne nemodificată:

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{10^{-8}}{10^{-10}} = 100$$

Deci la echilibru [B]=100[A], atât în absenţa cât şi în prezenţa catalizatorului, cu deosebirea că în prezenţa catalizatorului echilibrul se atinge de 10000 de ori mai repede.

- Catalizatorii participă direct la reacţie, şi la sfârşitul reacţiei se regăsesc în forma şi cantitatea iniţială, de aceea sunt necesari în cantitate mică.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CARACTERIZAREA ENZIMELOR

CARACTERIZARE DIN PUNCT DE VEDERE AL ROLULUI BIOLOGIC

Enzimele sunt catalizatori ai reacţiilor care au loc în organismele vii, cu alte cuvinte sunt biocatalizatori. Pe lângă proprietăţile generale ale catalizatorilor, au o serie de proprietăţi caracteristice.

Deşi se supun aceloraşi legi, enzimele diferă de catalizatorii clasici (chimici) prin câteva aspecte:

- ✓ au o putere catalitică superioară;

  La această concluzie se poate ajunge comparând valorile energiilor de activare (E_a) corespunzătoare unei reacţii desfăşurate în prezenţa unei enzime, respectiv în prezenţa unui catalizator clasic. De exemplu pentru reacţia de descompunere a H_2O_2 :

  $$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2$$

  E_a are valoarea 5,5Kcal/mol în prezenţa catalazei, 11,7 Kcal/mol în prezenţa Pt, şi 18 Kcal/mol în absenţa catalizatorului.

- ✓ au o capacitate catalitică enormă, măresc viteza reacţiilor de cel puţin 10^6 ori.

  De exemplu, anhidraza carbonică măreşte viteza de hidratare a CO_2 :

  $$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

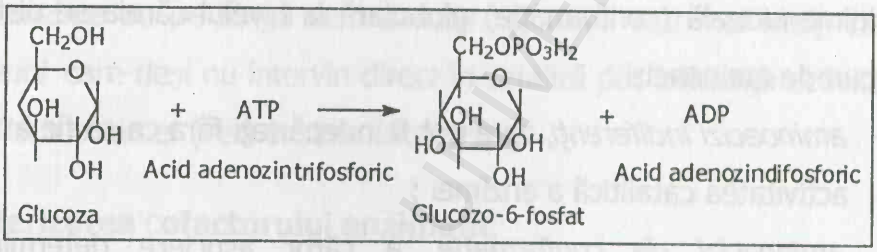
  de 10^7 ori, astfel că fiecare moleculă de enzimă sintetizează 10^5 molecule de H_2CO_3 per secundă;

- ✓ catalizează numai un anume tip de reacţie, cu alte cuvinte prezintă *specificitate de reacţie* (vezi clasificarea enzimelor);

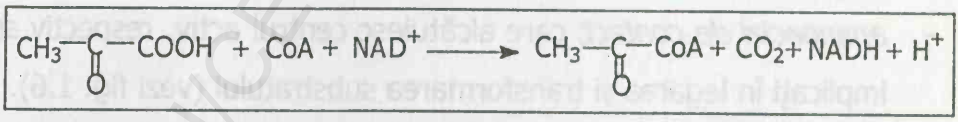
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- ✓ acţionează asupra unui anume compus chimic (substrat), cu alte cuvinte prezintă *specificitate pentru substrat*;
- ✓ sunt specifice atât în raport cu reactantul cât şi cu produsul de reacţie, ca urmare nu se formează produşi secundari;
- ✓ acţionează în condiţii blânde ($t<100\ ^0C$, presiunea≅1atm, pH≅7), randamentul reacţiilor fiind limitat doar de punctul de echilibru al reacţiei catalizate;
- ✓ realizează cuplarea reacţiilor exergonice cu reaţiile endergonice.

De exemplu, datorită hexokinazei, este posibilă cuplarea reacţiei de fosforilare a glucozei (endergonică) cu reacţia de hidroliză a ATP (exergonică):



- ✓ în vederea creşterii vitezei de desfăşurare a unei succesiuni de reacţii, enzimele corespunzătoare se asociază sub forma unor complexe multienzimatice. De exemplu, transformarea acidului piruvic în acetil-CoA:



este catalizată de piruvat decarboxilaza, dihidrolipoil transacetilaza şi dihidrolipoil dehidrogenaza care alcătuiesc complexul piruvat dehidrogenazei;

- ✓ activitatea lor este reglabilă, poate fi crescută sau micşorată prin acţiunea unor substanţe, altele decât substratele lor;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ pot cataliza transformarea unui tip de energie în alt tip de energie, de exemplu catalizează transformarea energiei chimice (înmagazinată sub formă de ATP) în energie mecanică (ex. contracţia musculară);

CARACTERIZARE DIN PUNCT DE VEDERE STRUCTURAL

Majoritatea enzimelor sunt proteine care pe lângă partea proteică, numită *apoenzimă,* au şi o parte neproteică, micromoleculară, numită *cofactor enzimatic.* Cele două componente formează împreună *holoenzima.*

Caracterizarea apoenzimei

Partea proteică a enzimei, sau apoenzima, are o structură tridimensională (conformaţie) globulară la nivelul căreia se disting 4 tipuri de aminoacizi :

- *aminoacizi indiferenţi*, care pot fi îndepărtaţi fără ca să fie afectată activitatea catalitică a enzimei ;
- *aminoacizi de conformaţie,* a căror asociere determină şi stabilizează conformaţia enzimei ; prin îndepărtarea lor activitatea enzimatică persistă dar enzima devine foarte fragilă ;
- *aminoacizi auxiliari,* care nu vin în contact cu substratul dar asigură mobilitatea zonelor situate în vecinătatea centrului activ;
- *aminoacizi de contact,* care alcătuiesc centrul activ, respectiv sunt implicaţi în legarea şi transformarea substratului (vezi fig. 1.6).

Regiunea din apoenzimă responsabilă de legarea şi transformarea substratului se numeşte *centru activ.*

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

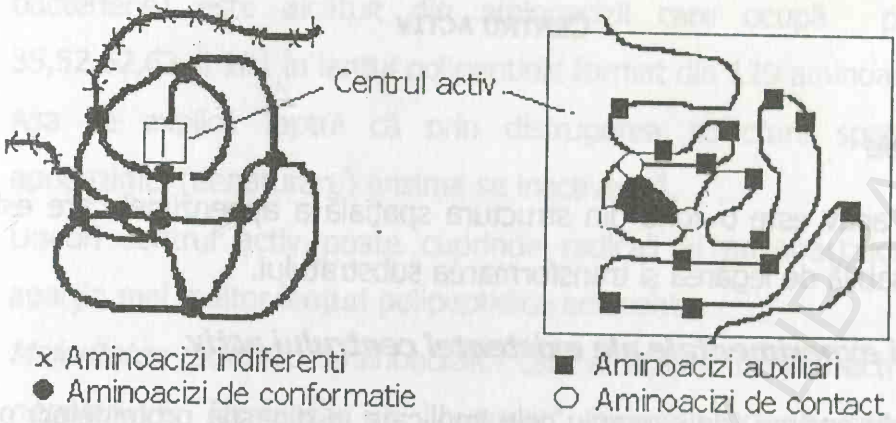


FIGURA 1.6.
Clasificarea aminoacizilor care alcătuiesc apoenzima în funcţie de rolul lor în stabilizarea conformaţiei respectiv în formarea centrului activ

Unele enzime au pe lângă centru activ şi unul sau mai mulţi *centrii allosterici* care deşi nu intervin direct în cataliză pot influenţa activitatea catalitică a enzimei (vezi enzime allosterice).

Caracterizarea cofactorului enzimatic

Cofactorul enzimatic poate fi de natură anorganică sau de natură organică. Cofactorul organic este denumit *coenzimă* sau *grupare prostetică*, după cum legătura cu apoenzima este slabă şi tranzitorie, respectiv puternică şi permanentă (vezi partea II-a).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CENTRU ACTIV

Definiţie

Centrul activ este o zonă din structura spaţială a apoenzimei care este responsabilă de legarea şi transformarea substratului.

Dovezi experimentale ale existenţei centrului activ

- Unele enzime (de exemplu cele implicate în digestia proteinelor) pot exista atât sub formă de proenzimă inactivă, cât şi sub formă de enzimă activă. Transformarea proenzimei inactive în enzima activă are loc prin îndepărtarea unui fragment peptidic sau a unui număr redus de aminoacizi. Deci presupune o modificare minimă, care vizează un centru preferenţial.
- În general substratele au dimensiuni mult mai mici decât apoenzima, deci zona de contact între enzimă şi substrat trebuie să fie foarte redusă.
- Prin mutageneză dirijată s-a evidenţiat faptul că anumiţi aminoacizi, puţini în raport cu numărul total al aminoacilor apoenzimei, sunt implicaţi în legarea şi transformarea substratului.

Caracterizarea centrului activ

- Centrul activ reprezintă *o parte relativ mică din volumul total al apoenzimei*. Deşi majoritatea enzimelor conţin peste 100 aminoacizi, numărul aminoacizilor care intră în contact cu substratul este <10.
- Centrul activ *este o entitate tridimensională*; este alcătuit din radicali ai aminoacizilor situaţi în diferite zone ale secvenţei liniare a apoenzimei. De exemplu, centrul activ al lizozimului (enzimă implicată în hidroliza peptidoglicanului din peretele celulelor

bacteriene) este alcătuit din aminoacizii care ocupă poziţiile 35,52,62,63 şi 101 în lanţul polipeptidic format din 129 aminoacizi. Aşa se explică faptul că prin distrugerea structurii spaţiale a apoenzimei (denaturare) enzima se inactivează.

- Uneori centrul activ poate cuprinde radicali ai aminoacizilor care aparţin mai multor lanţuri polipeptidice adiacente.
- *Majoritatea radicalilor* aminoacizilor care alcătuiesc centrul activ *sunt nepolari.* Ei formează un "buzunar" hidrofob, cu o constantă dielectrică mică, care facilitează interacţiunile de tip electrostatic între puţinele grupări ionice ale centrului activ şi substrat.
- Radicalii implicaţi în legarea substratului alcătuiesc *centrul de legare,* iar cei implicaţi în transformarea substratului alcătuiesc *centrul catalitic.* Centrul catalitic este format din *aminoacizii polari* (vezi mecanismul de acţiune).
- Centrul activ *are o conformaţie* (formă geometrică) *rigidă, complementară cu aceea a substratului;* (modelul Fischer sau"lock-and-key"), sau *flexibilă,* care se *adaptează conformaţiei substratului* (modelul Koshland sau "induced-fit") (vezi fig. 1.7).
- Ca urmare a complementarităţii sterice, substratul se poate apropia de radicalii centrului activ suficient de mult pentru a realiza numeroase interacţiuni van der Waals şi legături de hidrogen.
- Specificitatea enzimelor (pentru substrat şi de reacţie) depinde de compoziţia şi configuraţia centrului de legare, respectiv de compoziţia şi configuraţia centrului catalitic.

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

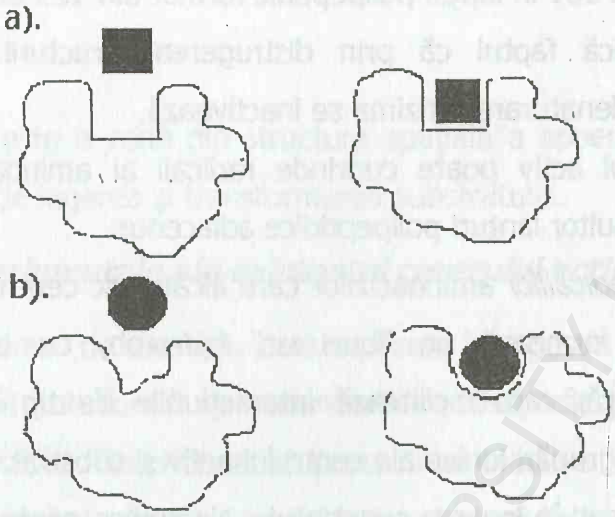


FIGURA 1.7.

a) Centrul activ este rigid şi are o conformaţie complementară cu aceea a substratului

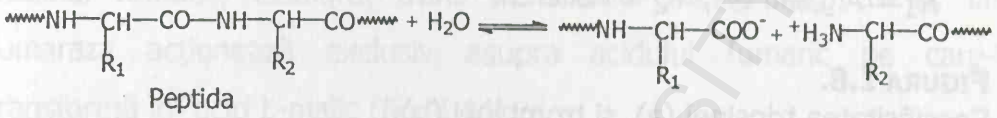
b) Centrul activ este flexibil şi îşi adaptează conformaţia astfel încât să fie complementară cu aceea a substratului

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SPECIFICITATEA ENZIMELOR

SPECIFICITATEA DE REACŢIE

Enzimele catalizează o singură reacţie chimică sau un set de reacţii asemănătoare, cu alte cuvinte acţiunea lor este selectivă. De exemplu enzimele proteolitice (proteaze, peptidaze) catalizează reacţia de hidroliză a legăturii peptidice:



Peptida

Majoritatea proteazelor catalizează şi reacţia de hidroliză a legăturii esterice, o legătură asemănătoare legăturii peptice:

Ester

Specificitatea de reacţie se datorează compoziţiei şi configuraţiei centrului catalitic, parte componentă a centrului activ (vezi mecanismul de acţiune).

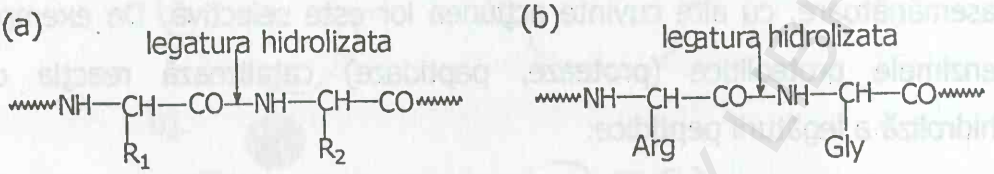
Specificitatea de reacţie reprezintă principalul criteriu de clasificare a enzimelor (vezi clasificare).

SPECIFICITATEA PENTRU SUBSTRAT

Enzimele pot avea *speficificitate absolută, specificitate de grup*, sau *specificitate relativă,* după cum leagă şi transformă un singur substrat, un număr mic de substrate, respectiv un set de substrate asemănătoare. De exemplu, subtilizina este o protează care hidrolizează legătura peptidică formată între orice fel de aminoacizi, deci prezintă specificitate largă pentru substrat. Tripsina, o altă protează, este capabilă să hidrolizeze numai legăturile peptidice formate între lizină sau

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

arginină şi orice alt aminoacid, deci prezintă specificitate de grup (fig. 1.8.a). Trombina, o protează implicată în coagularea sâgelui, hidrolizează doar legătura peptidică formată între arginină şi glicină, deci prezintă specificitate absolută (fig. 1.8.b).



R_1 = Arg sau Lys; R_2 = indiferent

FIGURA 1.8:
Specificitatea tripsinei (a), şi trombinei (b).

Alte exemple de enzime cu specificitate absolută pentru substrat sunt: ureaza (enzimă care hidrolizează exclusiv ureea) şi glucozo-6-fosfataza (enzimă care hidrolizează exclusiv esterul fosforic al glucozei).

Un caz special de specificitate pentru substrat este cel al fosfolipazelor A, B, C şi D, enzime care utilizează acelaşi substrat (fosfatidil colină), dar acţionează specific asupra celor 4 legături esterice din structura fosfolipidei (vezi fig. 1.9).

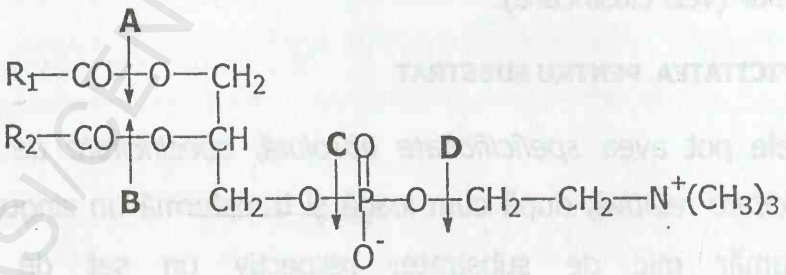
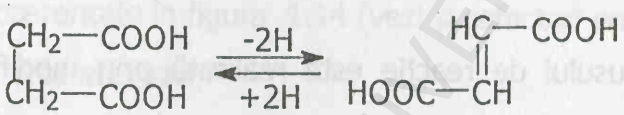


FIGURA 1.9.
Specificitatea de acţiune a fosfolipazelor A, B, C şi D

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

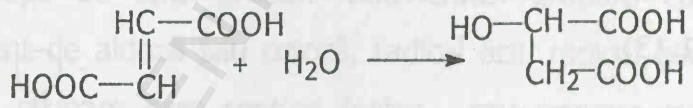
STEREOSPECIFICITATE

Specificitatea pentru substrat este *determinată atât de compoziţia cât şi de configuraţia centrului de legare*. Datorită asimetriei acestui centru de enzimele prezintă *stereospecificitate*, adică catalizează reacţii la care participă sau în care se formează un anume izomer steric (geometric sau optic). De exemplu succinat dehidrogenaza catalizeaza dehidrogenarea acidului succinic conducând întotdeauna la formarea acidului fumaric, izomerul trans al acidului maleic (fig. 1.10), iar fumaraza acţionează exclusiv asupra acidului fumaric pe care-l transformă în acid L-malic (fig. 1.11).



Acid succinic Acid fumaric

FIGURA 1.10.
Reacţia catalizată de succinat dehidrogenază

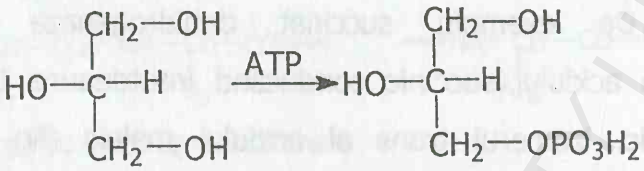


Acid fumaric Acid L-malic

FIGURA 1.11.
Reacţia catalizată de fumarază

În plus, datorită asimetriei centrului de legare, şi a faptului că în legarea substratului sunt implicate cel puţin 3 grupări diferite, enzimele sunt capabile să deosebească două grupări identice, dintr-o moleculă simetrică.

De exemplu glicerol kinaza poate deosebi cele două grupări hidroximetil (CH_2-OH) legate la C_2 din molecula simetrică a gliceroluluí. Ca urmare, dintr-o moleculă simetrică, prochirală (care conţine un carbon cu doi substitenţi identici şi doi substituenţi diferiţi (de tipul C_{aabc}) se formează numai produsul asimetric: acidul L-3-fosfogliceric (fig. 1.12).



Glicerol Acid L-3-fosfogliceric

FIGURA 1.12.
Reacţia catalizată de glicerol kinază

Asimetria produsului de reacţie este realizată prin modificarea uneia dintre cel două grupări identice, şi anume a aceleia care este situată pe partea care vine în contact cu centrul activ al enzimei. Această proprietate specială, numită *asimetrie biologică*, poate fi explicată observând faptul că substratul se poziţionează la centrul activ astfel încât numai unul (notat cu 2) dintre cei doi substituenţi identici (notaţi cu 2 şi 4) va veni în contact cu gruparea corespunzătoare din centrul catalitic (fig. 1.13).

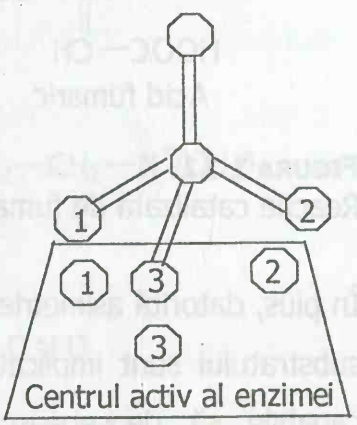


FIGURA 1.13.
Legarea prin trei puncte a substratului simetric la un centru de legare asimetric

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

CLASIFICAREA ENZIMELOR

Comisia Internaţională de Enzime a stabilit ca enzimele să fie grupate în 6 clase, în conformitate cu tipul reacţiei catalizate:

✓ **Clasa I: oxidoreductaze**

Oxidoreductazele sunt enzime care catalizează transferul de electroni, acompaniat sau nu de transferul de protoni, de la un substrat donor (S-H) la un cosubstrat acceptor (Co):

$$S\text{-}H + Co \rightarrow S + CoH$$

Aceste enzime pot cataliza oxido-reducerea grupărilor de tipul: CH-OH, CH-CH, C=O, CH-NH_2, CH=NH, şi formează mai multe subclase prezentate în figura 1.14 (vezi şi cofactori enzimatici).

✓ **Clasa II: transferaze**

Transferazele sunt enzime care catalizează transferul unei grupări funcţionale (X) de la un substrat donor (S_1) la un substrat acceptor (S_2), rolul de "cărăuş" al grupării funcţionale fiind îndeplinit de o coenzimă (Co) sau grupare prostetică:

$$S_1\text{-}X + Co \rightarrow S_1 + Co\text{-}X; \qquad S_2 + Co\text{-}X \rightarrow S_2\text{-}X + Co$$

În funcţie de tipul grupării transferate: grupare cu un carbon, fragment de aldoză sau cetoză, radical acil, radical glicozil, grupare amino, grupare care conţine fosfor, sau grupare cu sulf, aceste enzime pot face parte din diferite subclase (fig. 1.15).

✓ **Clasa III: hidrolaze**

Hidrolazele sunt enzime care catalizează reacţia de hidroliză, respectiv de clivare cu ajutorul apei, a legăturilor heterogene: C-O, C-N, C-S, O-P, existente în esteri, eteri, amide, anhidride. De exemplu hidroliza legăturii amidice:

$$S_1\text{-}CO\text{-}NH\text{-}S_2 + H_2O \rightarrow S_1\text{-}COOH + S_2\text{-}NH_2$$

BCU "CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY"

Ca urmare, enzimele din această clasă formează mai multe subclase: esteraze, glicozidaze, proteaze, ureaza, precum şi enzime care hidrolizează legăturile de tip anhidridă (fig. 1.16).

1.1.Subclasa CH-OH oxidoreductaze:

-alcool dehidrogenaza
Alcool + NAD^+ = Aldehidă sau cetonă + NADH + H^+

-glucoz oxidaza
Glucoză + O_2 = Gluconolactonă + H_2O_2

1.2.Subclasa aldehid sau ceton oxidoreductaze:

-triozfosfat dehidrogenaza
Gliceraldehid-3-fosfat + NAD^+ + P_i = 1,3-difosfo-glicerat + NADH + H^+

-xantin oxidaza
Xantină + H_2O + O_2 = Urat + H_2O_2

1.3.Subclasa CH-CH oxidoreductaze: dihidrouracil dehidrogenaza

4,5-Dihidrouracil + NAD^+ = Uracil + NADH + H^+

1.4.Subclasa CH-NH_2 oxidoreductaze:

Glutamat dehidrogenaza
Glutamat + H_2O + NAD^+ = 2-Cetoglutarat + NH_3 + NADH + H^+

L-Aminoacid oxidaza
L-Amnioacid + H_2O + O_2 = 2-Cetoacid + NH_3 + H_2O_2

1.6.Subclasa NAD^+ sau $NADP^+$ oxidoreductaze: NADH citocrom-C reductaza

NADH + Citocrom C_{ox} = NAD^+ + Citocrom C_{red}

1.9. Subclasa Hem oxidoreductaze: citocrom oxidaza

4Citocrom C_{red} + O_2 + $4H^+$ = 4Citocrom C_{ox} + $2H_2O$

1.11. Subclasa H_2O_2 oxidoreductazei: catalaza

H_2O_2 + H_2O_2 = O_2 + $2H_2O$

FIGURA 1.14.
Exemple de reacţii catalizate de enzimele din clasa oxidoreductaze

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1.Subclasa C_1 transferaze: guanidinacetat metiltransferaza

Guanidinacetat + S-Adenozilmetionină = Creatină + S-Adenozilhomocisteină

2.2.Subclasa enzime care transferă fragmente aldozice sau cetozice: transcetolaza

Sedoheptulozo-7-fosfat+Glicerinaldehid-3-fosfat = Ribozo-5-fosfat+Xilulozo-5-fosfat

2.3.Subclasa aciltransferaze: lipoat acetiltransferaza

Acetil-CoA + Dihidrolipoat = CoA + S-Acetildihidrolipoat

2.4.Subclasa glicoziltransferaze: metionin adenoziltransferaza

ATP + Metionină + H_2O = S-Adenozilmetionina + Trimetafosfat

2.6.Subclasa enzimelor care transferă grupări cu azot: aspartat aminotransferaza

Aspartat + 2-cetoglutarat = Oxalacetat + L-Glutamat

2.7.Subclasa enzimelor care transferă grupări cu fosfor: glucokinaza

ATP + Glucoză = ADP + Glucozo-6-fosfat

2.8.Subclasa enzimelor care transferă grupări cu sulf: 3-cetoacid CoA-transferaza

Acetilacetat + Succinil-CoA = Acetoacetil-CoA + Succinat

FIGURA 1.15.
Exemple de reacţii catalizate de enzimele din clasa transferaze

3.1. Subclasa esteraze: acetilcolinesteraza

Acetilcolină + H_2O = Colină + Acetat

3.2. Subclasa glicozidaze: amilaza

(α-Glucoză)$_n$ + H_2O = α-Glucoză + (α-Glucoză)$_{n-1}$

3.4. Subclasa peptidaze (proteaze): tripsina

---NH-Lys-CO-NH-Ala-CO--- + H_2O = ---NH-Lys-COOH + NH_2-Ala-CO---

3.5. Subclasa ureazei: ureaza

Uree + H_2O = CO_2 + $2NH_3$

3.6. Subclasa enzimelor care hidrolizează anhidride: ATP-aza

ATP + H_2O = ADP + Pi

FIGURA 1.16.
Exemple de reacţii catalizate de enzimele din clasa hidrolaze

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ **Clasa IV: liaze**

Liazele sunt enzime care catalizează reacţiile de îndepărtare a unei grupări (H_2O, CO_2, NH_3) altfel decât prin hidroliză, astfel încât în substrat apare o legătură dublă (C=C, C=O, C=S, C=N):

$$-CHX-CHY- \rightarrow -CH=CH- + XY$$

În funcţie de tipul legăturilor clivate în acest scop, liazele pot face parte din subclasa: C-C liaze, C-O liaze, C-N liaze (fig. 1.17).

4.1.Subclasa C-C liaze: histidin decarboxilaza

Histidină = histamină + CO_2

4.2.Subclasa C-O liaze: fumaraza

Malat = Fumarat + H_2O

4.3.Subclasa C-N liaze: argininosuccinat liaza

Argininosuccinat = fumarat + arginină

FIGURA 1.17.
Exemple de reacţii catalizate de enzimele din clasa liaze

✓ **Clasa V: izomeraze**

Izomerazele sunt enzime care catalizează reacţiile de rearanjare intramoleculară, respectiv de interconversie a izomerilor de poziţie, de funcţiune, geometrici sau optici:

$$R-CH(X)-CH_3 \rightarrow R-CH_2-CH_2X$$

Astfel, din această clasă fac parte mutazele, izomerazele, racemazele, epimerazele (fig. 1.18).

✓ **Clasa VI: Ligaze (sintetaze)**

Ligazele sunt enzime care catalizează reacţia de formare intermoleculară a legăturilor covalente de tip σ: C-C, C-O, C-S, C-N, folosind ca sursă de energie ATP. Aceste enzime sunt grupate, în conformitate cu tipul legăturii formate, în 4 subsclase (fig. 1.19).

BCU "ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY"

5.1.Subclasa racemaze şi epimeraze: UDP-glucozo 4-epimeraza

UDP-glucoză = UDP-galactoză

5.2.Subclasa cis-trans izomeraze: 11-cis-trans-retinal izomeraza

All trans-retinal = 11-Cis retinal

5.3.Subclasa oxido-reductaze intramoleculare: triozofosfat izomeraza

Gliceraldehid-3-fosfat = Dihidroxiaceton fosfat

5.3.Subclasa transferaze intramoleculare: fosfoglucomutaza

Glucozo-1-fosfat = Glucozo-6-fosfat

FIGURA 1.18.
Exemple de reacţii catalizate de enzimele din clasa izomeraze

6.1.Subclasa C-O ligaze: alanil-ARNt sintetaza

Alanină + ATP + ARN_t = Alanil-ARN_t + AMP + PPi

6.2.Subclasa C-S ligaze: succinil-CoA sintetaza (succinat tiokinaza)

Succinat + GTP + CoA = Succinil-CoA + GDP + Pi

6.3.Subclasa C-N ligaze: glutamin sintetaza

Glutamat + ATP + NH_4^+ = Glutamină + ADP + Pi

6.4.Subclasa C-C ligaze: acetil-CoA carboxilaza

Acetil-CoA + CO_2 + ATP = Malonil-CoA + ADP + Pi

FIGURA 1.19.
Exemple de reacţii catalizate de enzimele din clasa ligaze

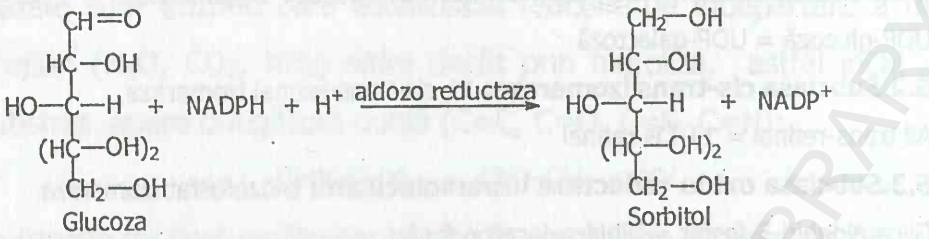
Observaţii

Dehidrogenazele sunt enzime care dehidrogenează diferite substrate folosind ca acceptori de hidrogen NAD^+, $NADP^+$, FMN. FAD (nu O_2 !):

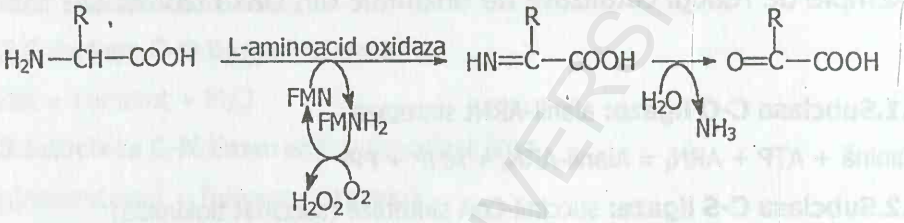
$$CH_3—CH_2—OH + NAD^+ \xrightarrow{\text{alcool dehidrogenaza}} CH_3—CH=O + NADH + H^+$$

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Uneori aceste enzime sunt denumite reductaze. De exemplu:

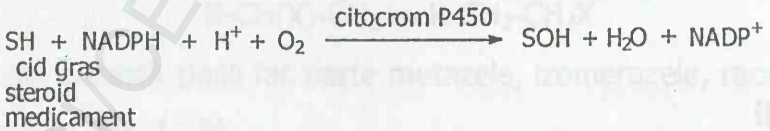


Oxidazele sunt enzime care oxidează diferite substrate folosind O_2 ca acceptor de electroni:



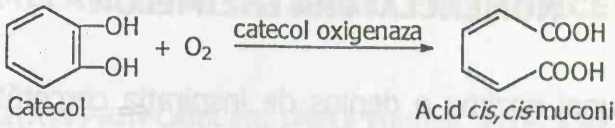
Peroxidazele oxidează substratul folosind ca donor de oxigen H_2O_2:

Hidroxilazele introduc o grupare hidroxil în diferite substrate, folosind O_2 ca donor de oxigen:



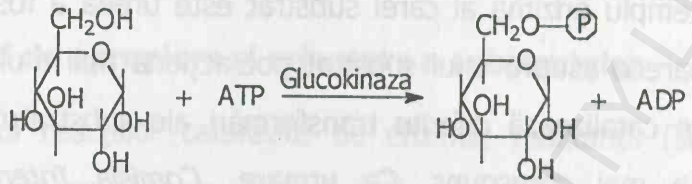
Oxigenazele catalizează incorporarea întregii molecule de oxigen concomitent cu clivarea oxidativă a unei legături C-C:

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

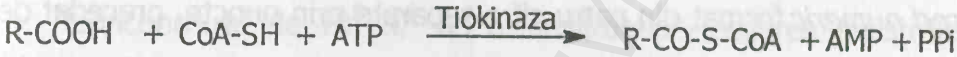


Catecol — Acid *cis,cis*-muconic

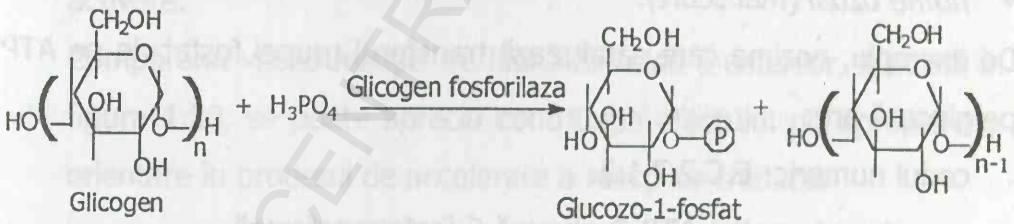
Kinazele catalizează transferul unei grupări fosfat de pe ATP (sau alt nucleozid trifosforilat) pe diferite substrate:



Tiokinazele catalizează formarea tioesterilor coenzimei A cu diferiţi acizi carboxilici, folosind ca sursă de energie ATP:

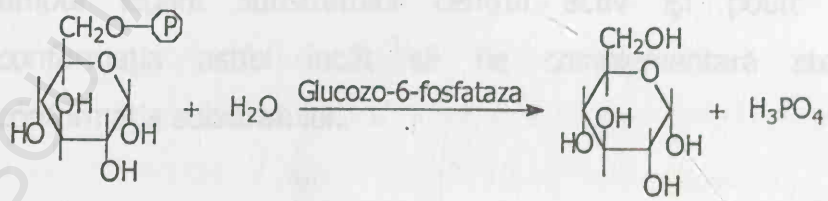


Fosforilazele catalizează reacţia "fosforoliza", respectiv de clivare a legăturilor glicozidice folosind H_3PO_4 în loc de H_2O:



Glicogen — Glucozo-1-fosfat

Fosfatazele catalizează hidroliza esterilor fosforici:



BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

NOMENCLATURA ENZIMELOR

Iniţial, numele unei enzime a depins de inspiraţia cercetătorului care a descoperit-o. De exemplu diferitele proteaze au fost denumite: pepsină, tripsină etc. Ulterior, enzimele au fost denumite în funcţie de substratul lor. Astfel, numele enzimei conţinea *denumirea substratului* plus sufixul *–ază*. De exemplu enzima al cărei substrat este ureea a fost denumită *urează*. Deoarece asupra unui substrat pot acţiona mai multe tipuri de enzime, care catalizează diferite transformări ale substratului, această regulă nu a mai corespuns. Ca urmare, *Comisia Internaţională a Enzimelor* din cadrul *Uniunii Internaţionale de Biochimie şi Biologie Moleculară (IUBMB)* a hotârât ca fiecărei enzime să i se dea un:

- ✓ *cod numeric* format din patru cifre separate prin puncte, precedat de literele E.C. (Enzyme Commission), care indică, clasa, subclasa, sub-subclasa, respectiv numărul de ordine în sub-sub-clasă;
- ✓ *nume sistematic* care indică natura substratului (donorului), natura cosubstratului (acceptorului) şi tipul reacţiei catalizate;
- ✓ *nume uzual* (mai scurt).

De exemplu, enzima care catalizează transferul grupei fosfat de pe ATP pe glucoză are:

- codul numeric: E.C.2.7.1.2.
- numele sistematic: ATP:D-glucoză 6-fosfotransferază
- numele uzual: glucokinază

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MECANISMUL CATALIZEI ENZIMATICE

MODALIŢĂŢI PRIN CARE ENZIMELE MĂRESC VITEZA REACŢIILOR

Enzimele au o capacitate catalitică enormă, pot să mărească viteza reacţiilor chimice de 10^6-10^{10} ori. E de aşteptat să ne întrebăm care sunt căile prin care enzimele reuşesc o asemenea performanţă.

✓ **Efectul de apropiere şi orientare a substratelor**

În cazul reacţiilor catalizate de enzime, reactanţii (substratele) trebuie să se lege la centrul activ al enzimei, cu alte cuvinte trebuie să formeze complexul enzimă-substrat (E-S). În acest fel, într-o zonă limitată ("buzunarul" centrului activ) are loc o "concentrare" de 10^5-10^6 ori a substratelor. Legarea substratelor nu se realizează la întâmplare; ele se fixează la centrul activ astfel încât să fie la o distanţă şi orientare optimă atât unul faţă de altul, cât şi faţă de grupările funcţionale ale centrului catalitic. Această poziţionare corectă facilitează conversia E-S în starea intermediară activată.

Comparând viteza reacţiei de hidroliză acidă a esterilor, ilustrată în figura 1.20, se poate aprecia contribuţia efectului de apropiere şi orientare în procesul de accelerare a reacţiilor chimice.

✓ **Efectul de adaptare sterică a centrului activ**

Majoritatea enzimelor posedă un centru activ relativ flexibil. În timpul legării substratului centrul activ îşi poate adapta conformaţia astfel încât să fie complementară steric cu conformaţia substratului.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

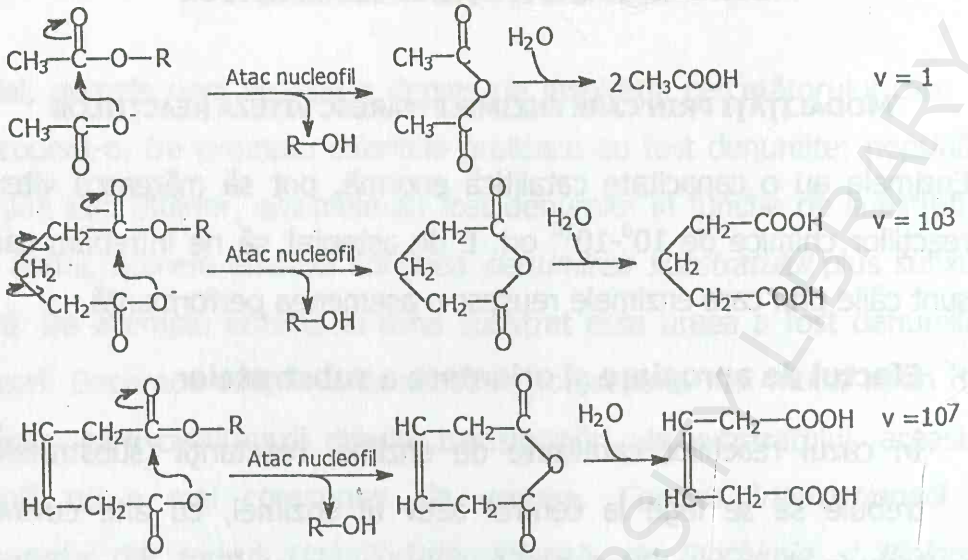


FIGURA 1.20.
Contribuţia efectului de apropiere şi orientare la accelerarea reacţiei de hidroliză acidă a esterilor.

Complementaritatea sterică permite realizarea unui număr mare de interacţiuni van der Waals şi legături de H cu substratul, precum şi orientarea adecvată, a grupărilor funcţionale care alcătuiesc centrul catalitic, faţă de substrat.

În plus, transformarea complexului E-S în complexul activat E-S* poate induce modificări conformaţionale ale centrului activ, modificări care facilitează creşterea numărului de legături cu starea de tranziţie a substratului şi contribuie astfel la stabilizarea acesteia (fig. 1.21).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

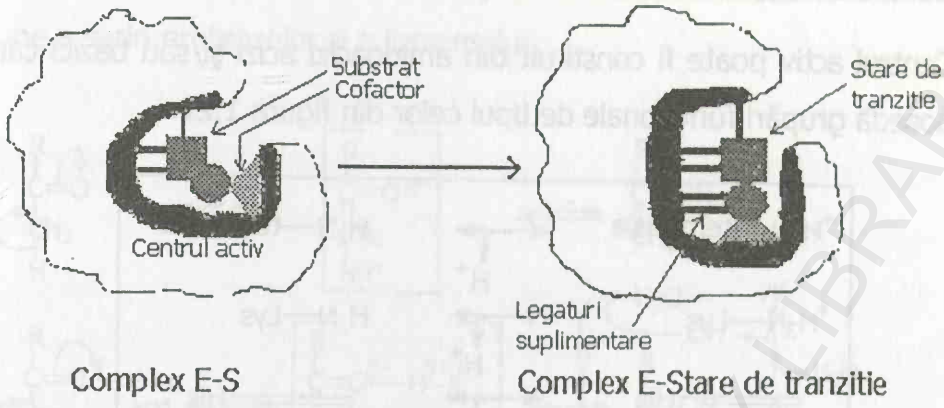


FIGURA 1.21.
Contribuţia efectului de adaptare sterică a centrului activ la stabilizarea stării de tranziţie

✓ **Efectul de distorsionare a substratului**

Uneori centrul activ al enzimei este suficient de rigid şi legăturile cu substratul sunt suficient de puternice pentru ca să oblige substratul să-şi adapteze conformaţia. Această schimbare facilitează trecerea substratului în starea de tranziţie şi contribuie astfel la accelerarea vitezei de transformare a substratului.

Acest efect poate fi exemplificat prin mecanismul de acţiune al lizozimului, care va fi descris ulterior.

✓ **Efectul de favorizare a interacţiunilor elctrostatice**

Legarea substratului la centrul activ, un "buzunar hidrofob", este însoţită de eliminarea moleculelor de apă de hidratare. Acest fapt asigură un mediu cu constantă dielectrică mică propice pentru realizarea unor legături electrostatice puternice care pot contribui la legarea substratului şi/sau a stării de tranziţie a acestuia.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

✓ Cataliza acido-bazică

Centrul activ poate fi constituit din aminoacizi acizi şi/sau bazici care posedă grupări funcţionale de tipul celor din figura 1.22.

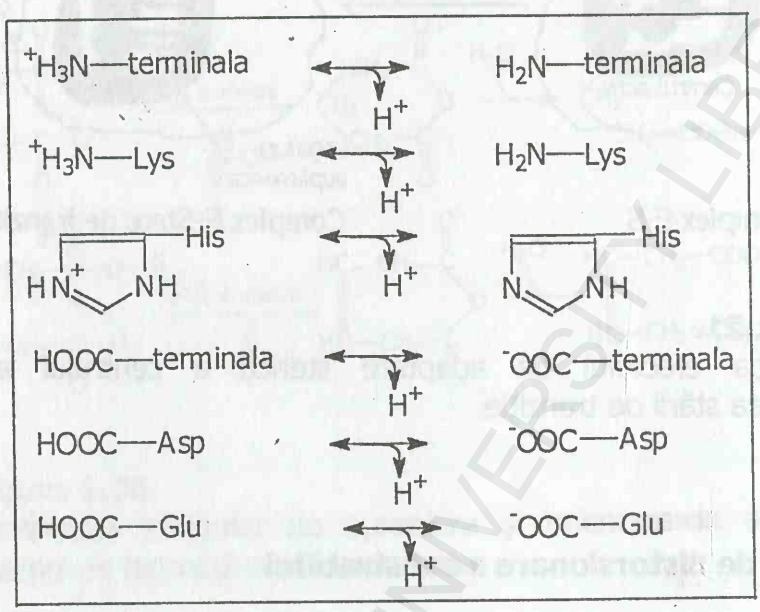


FIGURA 1.22.
Grupări funcţionale cu caracter acido-bazic din centrul activ

Aceste grupări, în funcţie de polaritatea mediului, pot fi protonate sau deprotonate, deci pot funcţiona ca şi catalizatori acizi, respectiv bazici.

Cataliza acidă este un proces prin care protonul catalizatorului contribuie la formarea şi/sau stabilizarea stării de tranziţie.

Cataliza bazică este un proces prin care catalizatorul extrage un proton din substrat şi astfel contribuie la formarea şi/sau stabilizarea stării de tranziţie. Pentru a înţelege aceste tipuri de cataliză vom da ca exemplu reacţia de tautomerie ceto-enolică (fig. 1.23).

Cataliza acido-bazică stă la baza accelerării vitezei reacţiilor de hidroliză a esterilor, eterilor şi peptidelor, reacţiilor de adiţie la

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

grupările carbonilice, etc. În consecinţă va contribui la mecanismul de acţiune a serin proteazelor şi a lizozimului.

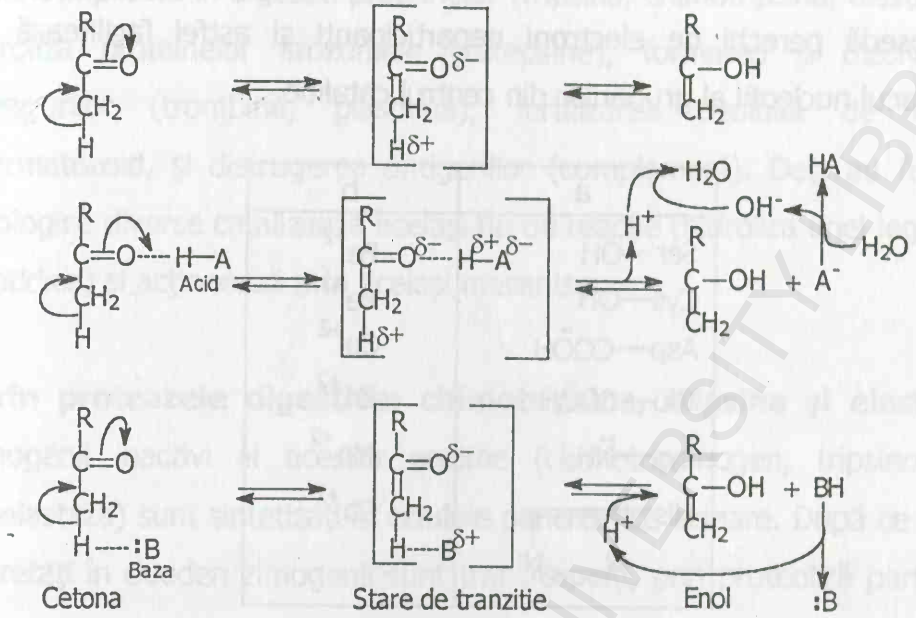


FIGURA 1.23.
Tautomeria ceto-enolică
a) necatalizată;
b) cu catalizator acid
c) cu catalizator bazic

✓ **Cataliza covalentă**

Prin cataliză covalentă se înţelege accelerarea vitezei prin formarea tranzitorie a unei legături covalente între enzimă şi substrat.

Aceasta presupune existenţa, în centrul catalitic al enzimei a:

- grupărilor cu perechi de electroni neparticipanţi (fig. 1.24.a) capabile să atace nucleofil centrii cu sarcină pozitivă din substrate;

BCU "IOAN SLAVICI" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- ionilor metalici pozitivi (fig. 1.24.b) care funcţionează ca acizi Lewis; sarcina lor fiind >1 indiferent de valoarea pH-ului, aceşti "superacizi" atacă electrofil substratele care conţin atomi ce posedă perechi de electroni neparticipanţi şi astfel facilitează atacul nucleofil al grupărilor din centrul catalitic.

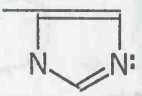
a	b
Ser—ÖH	Fe^{+2}
Cys—ÖH	Fe^{+3}
Asp—COÖH	Cu^{+2}
Glu—COÖH	Zn^{+2}
Lys—N̈H$_2$	Mn^{+2}
His 	Co^{+2}

FIGURA 1.24.
Grupări şi ioni implicaţi în cataliza covalentă

Cataliză covalentă, prin atac nucleofil, poate fi întâlnită la mecanismul de acţiune a serin proteazelor. Cataliza covalentă, prin atac electrofil urmat de atacul nucleofil, poate fi ilustrată folosind ca exemplu mecanismul de acţiune a carboxipeptidazei.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MECANISMUL DE ACŢIUNE A SERIN PROTEAZELOR

Serin proteazele sunt o familie de enzime care au în centrul activ serină şi sunt implicate în digestia proteinelor (tripsina, chimotripsina, elastaza), hidroliza proteinelor lizozomale (catepsine), formarea şi dizolvarea cheagurilor (trombina, plasmina), fertilizarea ovulului de către spermatozoid, şi distrugerea antigenilor (complement). Deşi au funcţii fiziologice diverse catalizează acelaşi tip de reacţie (hidroliza unei legături peptidice) şi acţionează prin acelaşi mecanism.

Serin proteazele digestive: chimotripsina, tripsina şi elastaza

Zimogenii inactivi ai acestor enzime (chimotripsinogen, tripsinogen, proelastaza) sunt sintetizaţi în celulele pancreatice acinare. După ce sunt secretaţi în duoden zimogenii sunt transformaţi, prin proteoliză parţială, în enzime active care acţionează specific asupra legăturilor peptidice din proteinele supuse digestiei intestinale (fig.1.25).

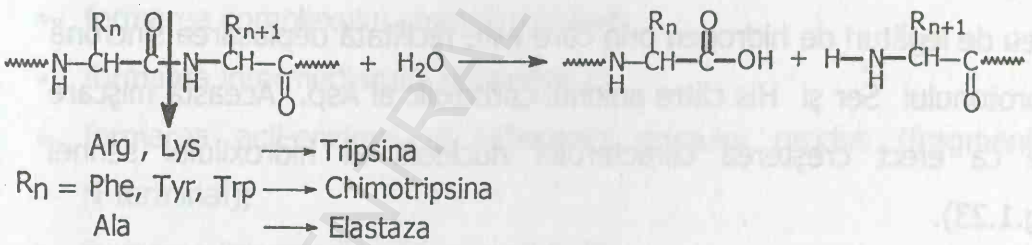


FIGURA 1.25.
Acţiunea specifică a serin proteazelor digestive

Deşi diferite ca lungime, aceste endopeptidaze au o secvenţă care se suprapune în proporţie de 50% în cazul tripsinei şi chimotripsinei, respectiv de 25% dacă intră în discuţie şi elastaza. Ca urmare, este de aşteptat ca structura lor tridimensională să fie asemănătoare.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Faptul că aceste enzime hidrolizează diferite legături peptidice se datorează diferenţelor existente în "buzunarul" care reprezintă centrul de legare (fig. 1.24).

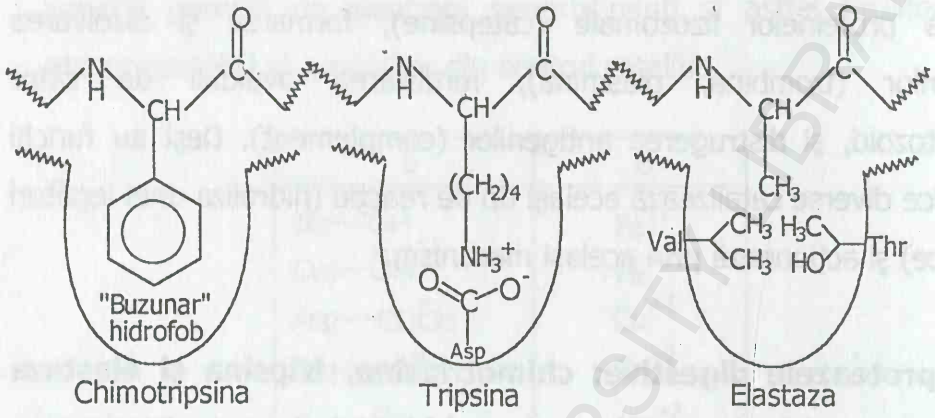


FIGURA 1.24.
Centrul de legare a substratului serin proteazelor digestive

Centrul catalitic al acestor enzime este format din triada: Asp, His, Ser. Poziţia relativă a radicalilor acestor aminoacizi permite formarea unui releu de legături de hidrogen prin care este facilitată deplasarea sincronă a protonului Ser şi His către anionul carboxilic al Asp. Această mişcare are ca efect creşterea caracterului nucleofil al hidroxilului serinei (fig.1.23).

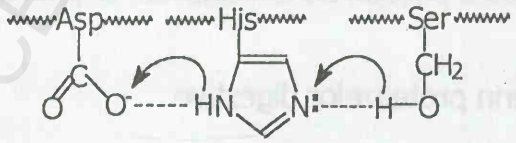


FIGURA 1.23.
Centrul catalitic al serin proteazelor digestive

Histidina (în forma protonată) are în plus rolul de a protona gruparea amino rezultată prin clivarea legăturii peptidice.

BCU ASICENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Mecanismul clivării neenzimatice a legăturii peptidice, prezentat în figura 1.24, ilustrează faptul că atacul nucleofil (al ionului hidroxil al H_2O) asupra carbonului legăturii peptidice este urmat de formarea unui oxoanion tetraedric instabil care se descompune cu formarea celor două fragmente ale lanţului polipeptidic.

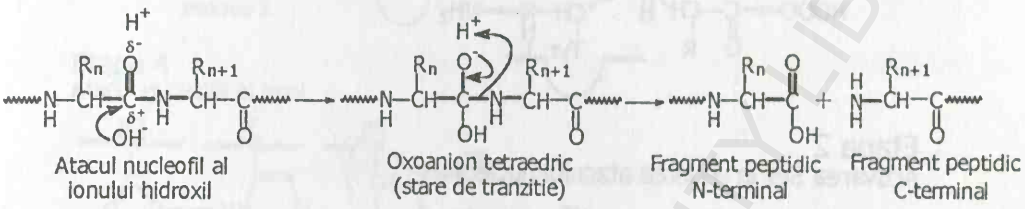


FIGURA 1.24.
Mecanismul proteolizei neenzimatice

Mecanismul proteolizei enzimatice este un exemplu de cataliză covalentă asistată de cataliza acido-bazică. În acest caz hidroliza legăturii peptidice presupune parcurgerea a 5 etape:

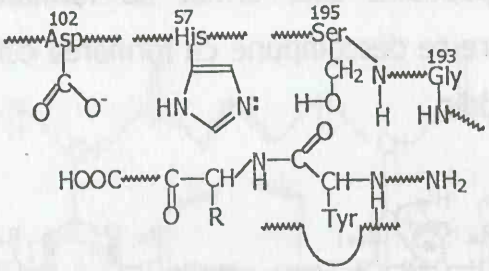
- formarea complexului enzimă-substrat;
- formarea intermediarului tetraedric I;
- formarea acil-enzimei şi eliberarea primului produs (fragmentul N-terminal);
- formarea intermediarului tetraedric II;
- eliberarea celui de-al doilea produs (fragmentul C-terminal).

Transformările care au loc din momentul formării complexului E-S până la eliberarea ultimului produs sunt ilustrate în figurile 1.25 şi 1.26 folosind ca exemplu chimotripsina.

BCU "AS" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

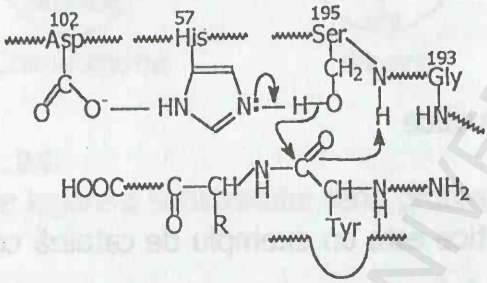
Etapa 1

Formarea complexului enzima-substrat

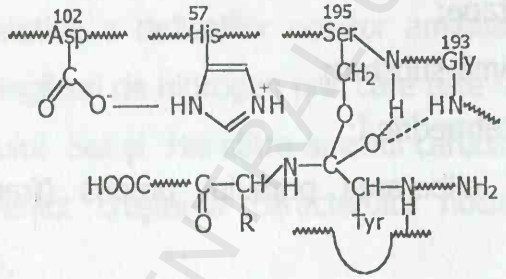


Etapa 2

Activarea Ser in vederea atacului nucleofil



Formarea intermediarul tetraedric I stabilizat prin legaturi de



Etapa 3

Clivarea legaturii peptidice

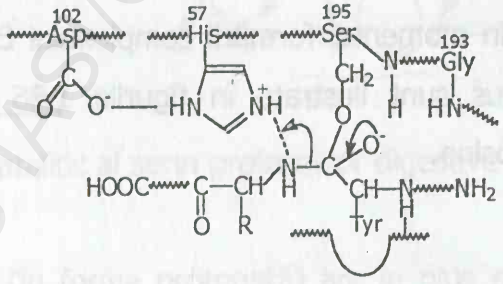


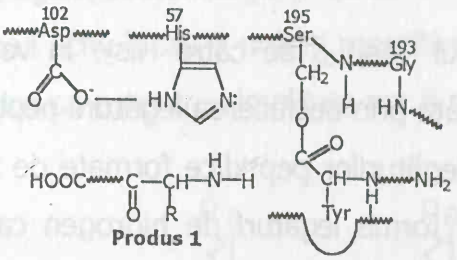
FIGURA 1.25.

Mecanismul de acţiune a chimotripsinei (etapele 1, 2, 3)

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

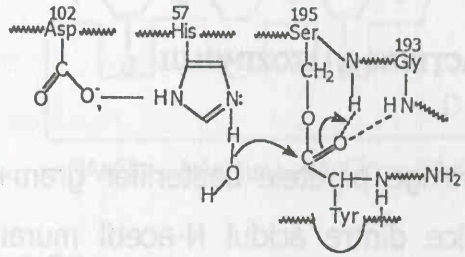
Etapa 3 (continuare)

Acil-enzima

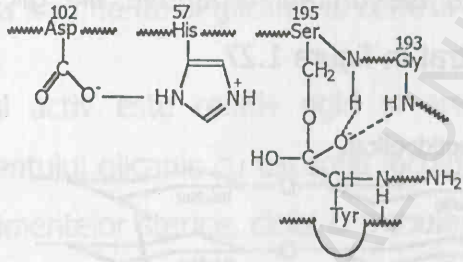


Etapa 4

Atacul nucleofil al apei

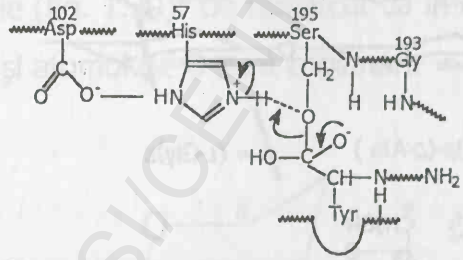


Intermediarul tetraedric II



Etapa 5

Clivarea legaturii covalente



Eliberarea produsului 2

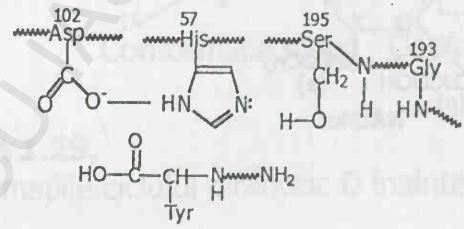


FIGURA 1.26.
Mecanismul de acţiune a chimotripsinei (etapele 3,4,5)

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De remarcat că, formarea primului intermediar tetraedric induce o modificare conformaţională care:

- facilitează extragerea protonului Asp_{102} de către His_{57} în vederea protonării grupării amino rezultată prin desfacerea legăturii peptidice;
- poziţionează grupările NH ale legăturilor peptidice formate de Ser_{195} şi Gly_{193} astfel încât să poată forma legături de hidrogen care să stabilizeze oxoanionul.

MECANISMUL DE ACŢIUNE A LIZOZIMULUI

Lizozimul este o enzimă care distruge peretele bacteriilor gram+ prin hidroliza legăturii β-(1-4)-glicozidice dintre acidul N-acetil muramic şi N-acetil glucozamină, componente ale unităţii repetitive ale glicanului care formează peptidoglicanul ilustrat în figura 1.27.

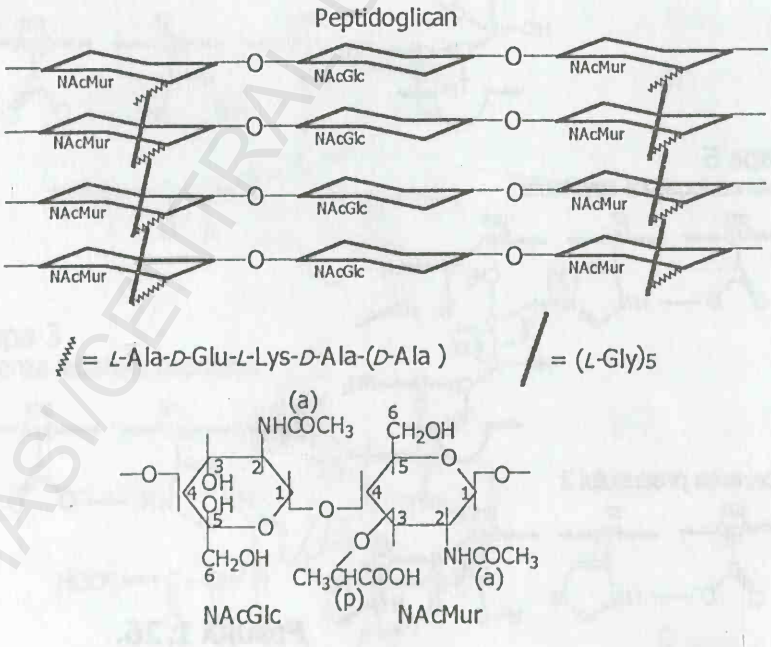


FIGURA 1.27.
Structura peptidoglicanului care formează pereţii bacteriilor gram+

Se găseşte în celule şi secreţii (lacrimi, salivă, mucus), unde îndeplineşte rolul de agent bacteriologic (implicat în apărarea imună nespecifică).
La centrul activ încap 3 unităţi repetitive ale glicanului, respectiv 6 cicluri piranozice care pentru simplitate vor fi notate cu A,B,C,D,E,F (fig. 1.28).

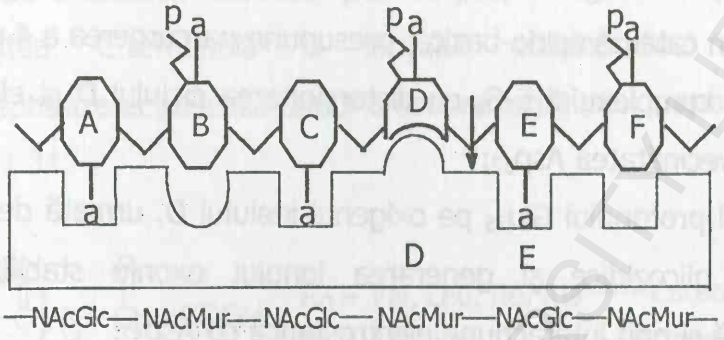
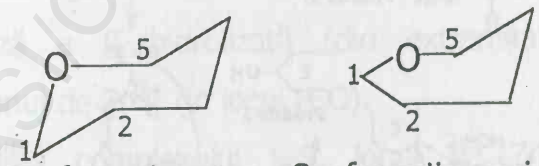


FIGURA 1.28.
Legarea fragmentului glicanic la centrul activ al lizozimului

Centrul activ este relativ rigid şi are o conformaţie complementară fragmentului glicanic cu excepţia locului de fixare a ciclului D. Din cauza impedimentelor sterice, ciclul D trebuie să se adapteze conformaţional şi să treacă din forma scaun în forma semiscaun, specifică stării de tranziţie (fig. 1.29). De remarcat că în conformaţia semiscaun atomii C_1, C_2, C_5 şi atomul de O sunt coplanari.



Conformatia scaun Conformatia semi scaun

FIGURA 1.29.
Conformaţiile ciclului piranozic D înainte şi după legarea le centrul activ

BUJIASICENTRALUNIVERSITY LIBRARY

Centrul catalitic al lizozimului este format din Glu_{35} şi Asp_{52} , situaţi de-o parte şi de alta a legăturii glicozidice ce urmează a fi hidrolizată. Asp se găseşte într-un mediu polar, iar Glu într-un mediu nepolar. Ca urmare, la pH-ul optim (pH=5-6) carboxilul Asp este deprotonat iar carboxilul Glu este protonat.

Hidroliza, prin cataliză acido-bazică, presupune parcurgerea a 4 etape:

- formarea complexului E-S, cu distorsionarea ciclului D şi eliminarea H_2O din vecinătatea Asp_{52};
- transferul protonului Glu_{35} pe oxigenul inelului D, urmată de clivarea legăturii glicozidice şi generarea ionului oxoniu stabilizat prin rezonanţă şi prin interacţiune electrostatică cu Asp_{52};
- eliberarea inelului E;
- atacul apei asupra ionului oxoniu, eliberarea inelului D şi reprotonarea Glu_{35} (fig. 1.30).

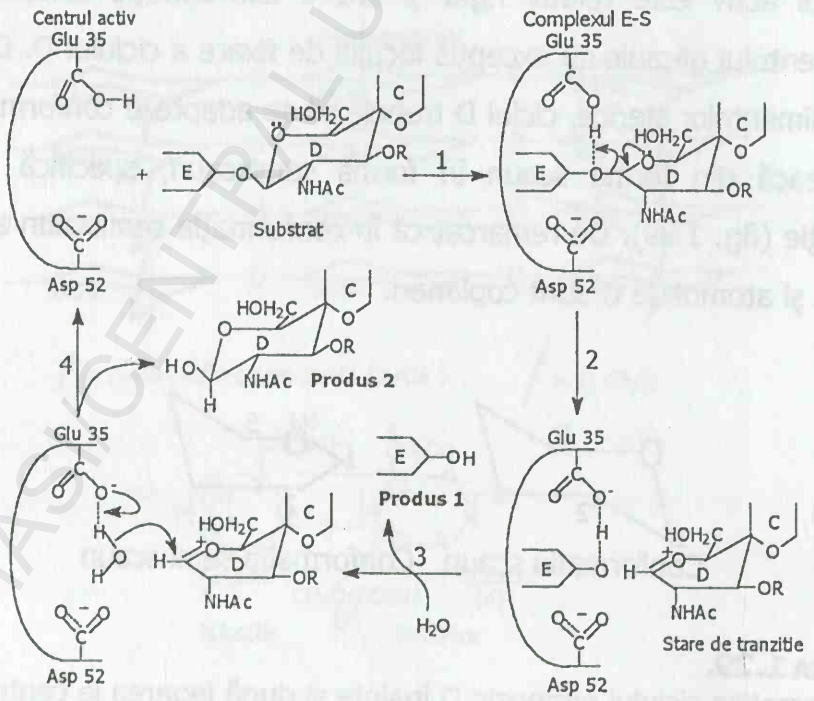


FIGURA 1.30.
Mecanismul de acţiune a lizozimului

MECANISMUL DE ACŢIUNE A CARBOXIPEPTIDAZELOR

Carboxipeptidazele A şi B sunt exopeptidaze secretate de pancreas sub formă de zimogeni inactivi numiţi procarboxipeptidaze.

Au rolul de a cataliza hidroliza, pas cu pas, a legăturilor peptidice din extremitatea C-terminală a lanţului polipeptidic. Cele două carboxipeptidaze acţionează specific asupra legăturilor peptidice indicate în figura 1.31.

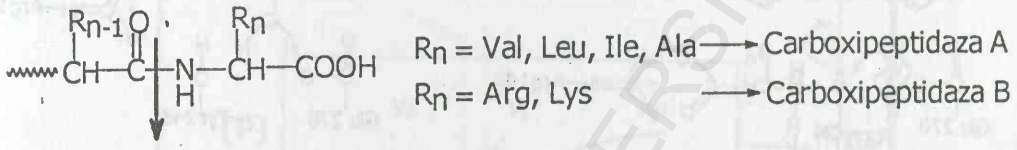


FIGURA 1.31.
Acţiunea specifică a carboxipeptidazelor A şi B

Carboxipeptidazele sunt metaloenzime care posedă în centrul catalitic un ion Zn^{2+}. Acesta este legat de enzimă prin 3 legături coordinative. În cazul carboxipeptidazei A, Zn^{2+} este coordinat de His_{69}, His_{196} şi Glu_{72}.

În absenţa substratului cea de-a 4 coordinaţie se realizează cu H_2O. Din centrul catalitic face parte şi Glu_{270}, Tyr_{248} şi Arg_{145}(fig. 12).

Substratul este legat la centrul activ astfel ca oxigenul legăturii peptidice care urmează a fi hidrolizată (din extremitatea C-terminală) să coordineze ionul de Zn^{2+} (în locul H_2O).

După formarea complexului E-S, ionul de Zn^{2+} atrage electronii oxigenului legăturii peptidice şi astfel măreşte sarcina pozitivă a carbonului carbonilic. În acelaşi timp Glu_{270} acţionează ca o bază: extrage protonul H_2O şi astfel facilitează atacul ei nucleofil asupra carbonului carbonilic. Ca urmare, C atacat devine tetravalent. În

DOCUMENTAREA UNIVERSITY LIBRARY

următoarea etapă, prin intervenţia hidroxilului Tyr_{248}, are loc descompunerea *intermediarului tetraedric* cu eliberarea peptidei (fig. 1.32). Acţiunea sinergică a Zn^{2+} şi a Glu_{270} determină o accelerare a vitezei şi explică capacitatea catalitică net superioară a acestor enzime în raport cu alte proteaze (ex. k_{cat} = 100 k_{cat} a tripsinei).

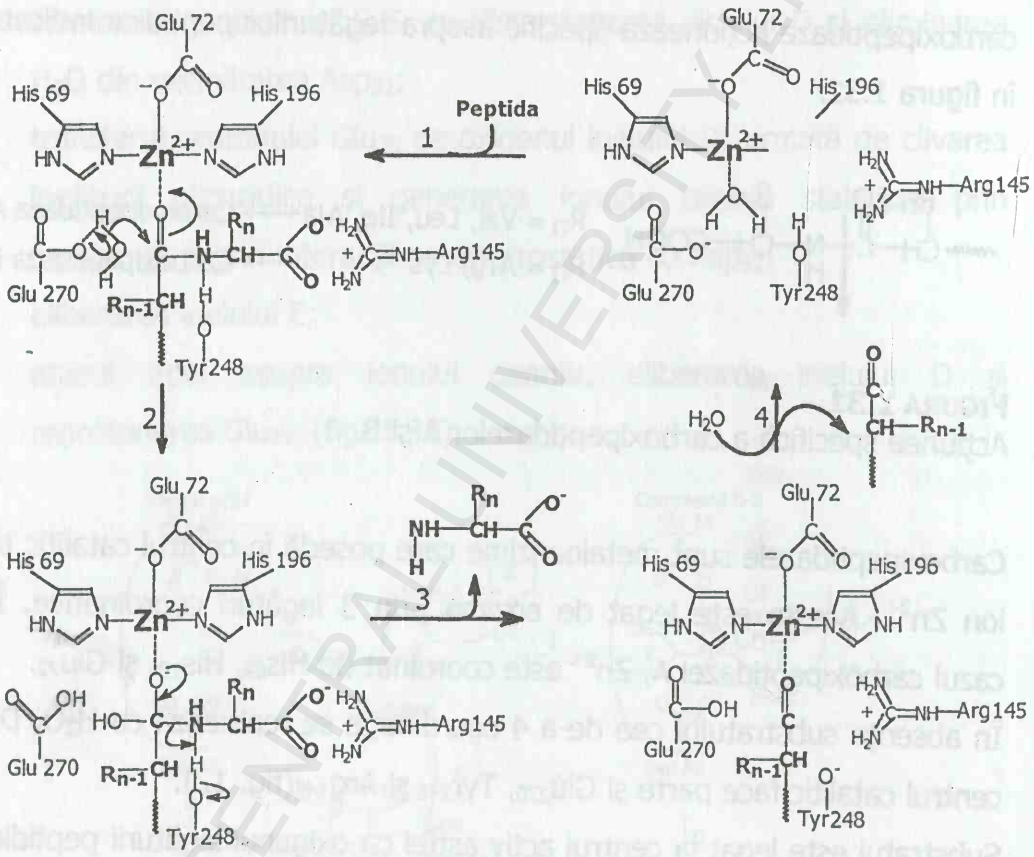


FIGURA 1.32.
Mecanismul de acţiune a carboxipeptidazei A

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ

CINETICA REACŢIILOR ENZIMATICE

Viteza iniţială a reacţiilor enzimatice

Viteza iniţială a unei reacţii cataţizate enzimatic, de tipul:

$$S \underset{}{\overset{E}{\rightleftharpoons}} P$$

creşte cu concentraţia substratului [S] până la o anumită valoare limită caracteristică fiecărei enzime (fig. 1.33).

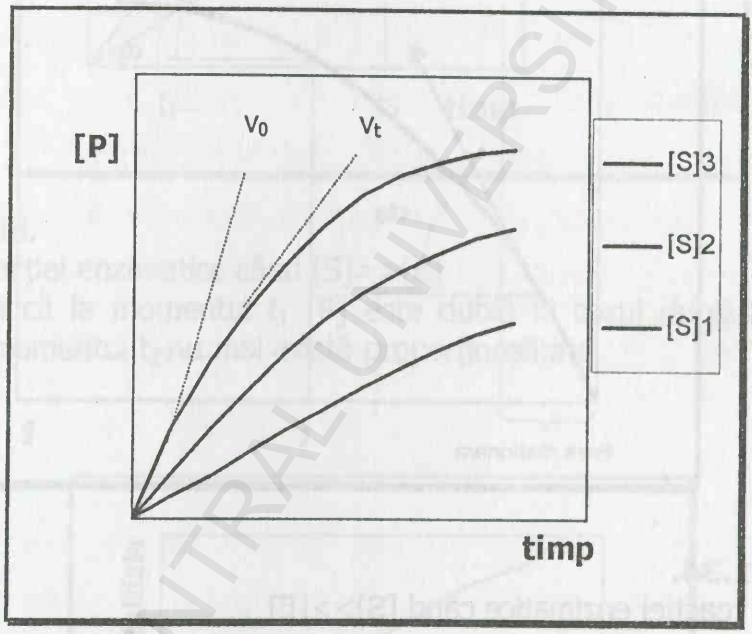


FIGURA 1.33.
Variaţia vitezei iniţiale a reacţiilor enzimatice funcţie de [S]

Dacă concentraţia substratului [S] este mult mai mare decât concentraţia enzimei [E], se pot distinge 3 faze:

- faza prestaţionară (câteva milisecunde), în timpul căreia are loc formarea rapidă a complexului enzimă-substrat (E-S).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- faza staţionară (minute→ore), pe durata căreia enzima este saturată cu substrat, concentraţia complexului E-S este maximă şi constantă. În această fază viteza de reacţie este constantă, independentă de [S] (cinetica reacţiei este de ordinul zero).
- faza post-staţionară (de echilibru), în care [S] scade exponenţial, şi viteza descreşte ca şi în cazul reacţiilor necatalizate (vezi fig. 1.34).

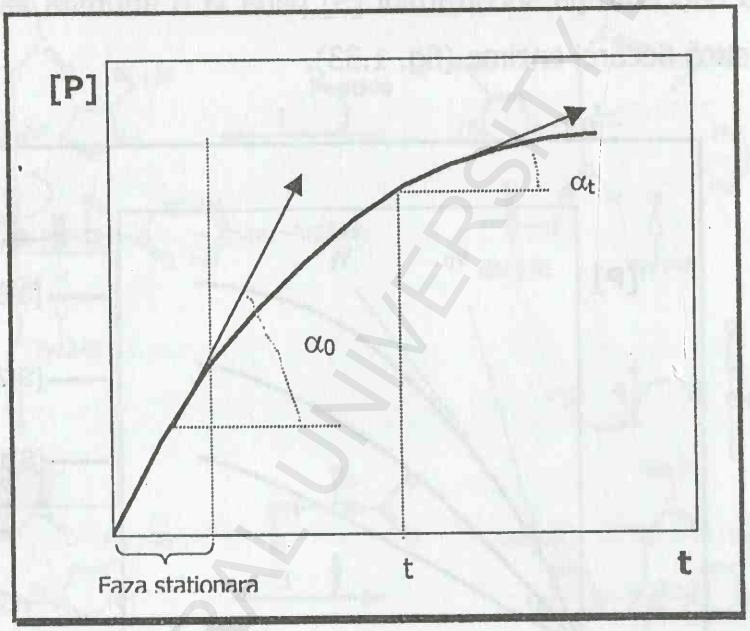


FIGURA 1.34.
Cinetica reacţiei enzimatice când [S]>>[E]

Viteza reacţiilor enzimatice se măsoară în faza staţionară, când viteza iniţială v_0 depinde numai de cantitatea de enzimă prezentă.

Influenţa concentraţiei enzimei

Dacă se determină viteza iniţială v_0 la o concentraţie saturantă de substrat şi concentraţii crescătoare de enzimă se observă că v_0 creşte

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

proporţional cu concentraţia enzimei până la o anumită valoare limită care corespunde solubilităţii maxime a enzimei (fig. 1.35 şi 1.36).

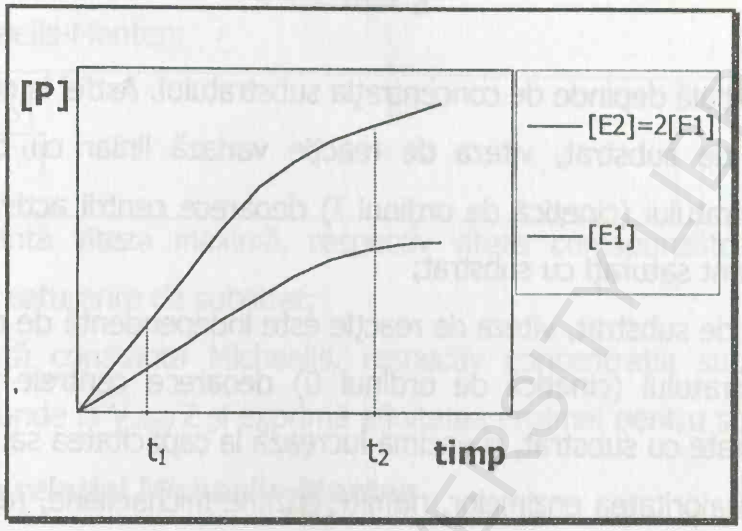


FIGURA 1.35.
Cinetica reacţiei enzimatice când [S]>>[E]
Se observă că la momentul t_1 [P] este dublă în cazul dublării [E], în schimb la momentul t_2 nu mai există proporţionalitate

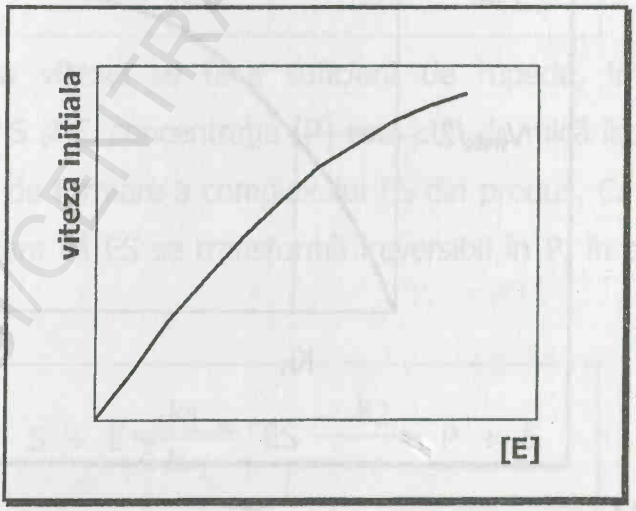


FIGURA 1.36.
Dependenţa vitezei iniţiale de [E].

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Efectul concentraţiei substratului. Relaţia Michaelis-Menten

Pentru o recţie enzimatică simplă, de tipul:

$$S \underset{}{\overset{E}{\rightleftharpoons}} P$$

viteza iniţială depinde de concentraţia substratului. Astfel la concentraţii:

- mici de substrat, viteza de reacţie variază liniar cu concentraţia substratului (cinetică de ordinul I) deoarece centrii activi ai enzimei nu sunt saturaţi cu substrat;
- mari de substrat, viteza de reacţie este independentă de concentraţia substratului (cinetică de ordinul 0) deoarece centrele active sunt saturate cu substrat, şi enzima lucrează la capacitatea sa maximă.

Pentru majoritatea enzimelor, numite enzime michaeliene, reprezentarea grafică a dependenţei vitezei iniţiale de concentraţia substratului are forma unei hiperbole (fig. 1.37).

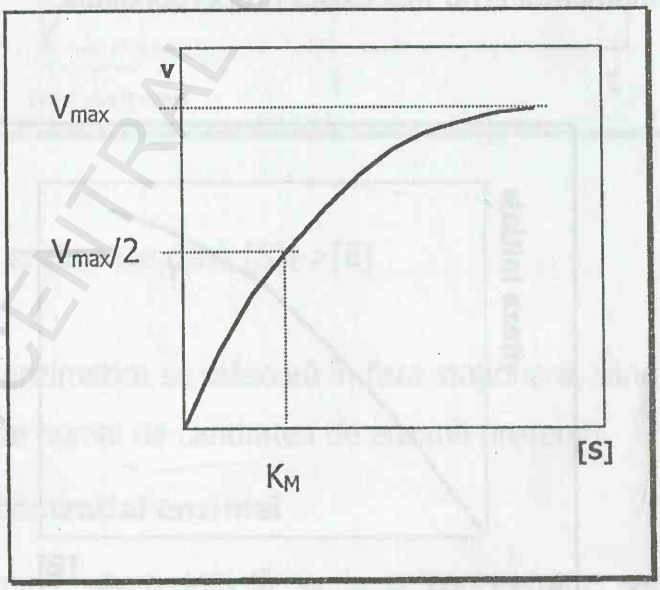


FIGURA 1.37.
Dependenţa vitezei iniţiale de [S].

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY IAŞI

Unele enzime michaeliene (ex. acetil colinesteraza) sunt inhibate la concentraţii mari de substrat.

Curba hiperbolică caracteristică enzimelor michaeliene este descrisă de relaţia Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \qquad (1.18)$$

V_{max} reprezintă viteza maximă, respectiv viteza corespunzătoare unei concentraţii saturante de substrat;

K_M reprezintă constanta Michaelis, respectiv concentraţia substratului care corespunde la $V_{max}/2$ şi exprimă afinitatea enzimei pentru substrat.

Deducerea relaţiei Michaelis-Menten

Deducerea relaţiei Michaelis-Menten s-a realizat pornind de la presupunerea lui Henri că transformarea substratului S de către enzima E are loc în conformitate cu ecuaţia:

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} P + E$$

Dacă măsurarea vitezei se face suficient de repede, imediat după contactul dintre S şi E, concentraţia [P] este atât de mică încât se poate neglija procesul de formare a complexului ES din produs. Ca urmare, ES se poate considera că ES se transformă ireversibil în P, în conformitate cu ecuaţia:

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + E$$

Pentru deducerea vitezei de transformare a substratului în produs se recurge s-au folosit o serie de premize simplificatoare:

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- etapa limitantă de viteză este reacţia de descompunere a complexului enzimă-substrat, a cărei viteză este dată de relaţia 1.19;

$$v = k_2[ES] \tag{1.19}$$

- la un moment dat se atinge starea staţionară în care viteza de formare a ES este egală cu viteza de descompunere a ES;

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \tag{1.20}$$

La aceste ipoteze se mai adugă şi faptul că la un moment dat enzima se găseşte atât în stare liberă, cât si sub formă de complex ES. Ca urmare:

$$[E_t] = [E] + [ES] \tag{1.21}$$

Pe baza acestei relaţii se deduce că:

$$[E] = [E_t] - [ES] \tag{1.22}$$

Înlocuind [E] în relaţia 1.20. se obţine:

$$k_1\{[E_t] - [ES]\}[S] = k_2[ES] + k_{-1}[ES] \tag{1.23}$$

Pe baza acestei relaţii se obţine valoarea [ES]:

$$[ES] = \frac{k_1[Et][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \tag{1.24}$$

Prin rearanjarea termenilor se obţine:

$$[ES] = [E_t]\frac{[S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \tag{1.25}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Înlocuind valoarea [ES] în expresia 1.19. se obţine:

$$v = k_2[E_t]\frac{[S]}{[S]+\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}} \qquad (1.26)$$

unde $V_{max}=k_2[E_t]$ şi $K_M=(k_{-1}+k_2)/k_1$.

Semnificaţia K_M

Pentru a vedea semnificaţia K_M să presupunem că $[S]=K_M$. Numitorul expresiei 1.26. va fi egal cu 2[S] şi v=Vmax/2. Deci K_M reprezintă acea concentraţie de substrat pentru care se atinge jumătate din viteza maximă. K_M are aceaşi dimensiune ca şi concentraţia (M) deoarece constantele de viteză k_{-1} şi k_2 se exprimă în s^{-1}, şi k_1 se exprimă în $M^{-1}s^{-1}$. Dacă $[S]<<K_M$, atunci numitorul expresiei 1.26. devine aproximativ egal cu K_M, şi viteza va fi aproximativ egală cu $V_{max}[S]/K_M$, deci variază liniar cu concentraţia substratului.În schimb, dacă $[S]>>K_M$ numitorul expresiei 1.26. devine aproximativ egal cu [S] şi viteza va fi egală cu V_{max}, deci va fi constantă indiferent de valoarea [S].

Deoarece k_{-1} este mult mai mare decât k_2, K_M poate fi aproximativ egală cu k_{-1}/k_1, raport care reprezintă constanta de disociere a complexului ES. Ca urmare, valoarea K_M dă informaţii despre afinitatea enzimei pentru un anume substrat. Cu cât valoarea este mai mică afinitatea pentru substrat este mai mare. Valoarea K_M este în general situată în domeniul 10^{-6}-10^{-1}, apropiată de concentraţiile intracelulare ale substratelor. Izoenzimele unei enzime precum şi enzimele mutante au afinitate diferită pentru un anume substrat. Acest fapt poate explica apariţia unor stări fiziologice anormale. De exemplu, asiaticii au o sensibilitate neobişnuită faţă de alcool. Consumul unei cantităţi reduse de alcool determină vasodilataţie,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

înroşirea feţei şi palpitaţii. Aceste efecte fiziologice sunt determinate de acetaldehida generată de alcool dehidrogenază. În mod normal, acetaldehida este convertită de aldehid dehidrogenaza mitocondrială în acetat. Asiaticilor le lipseşte această enzimă. Posedă în schimb, acetaldehid dehidrogenază citoplasmatică care are afinitate foarte mică pentru substrat (K_M mare). Ca urmare, după un consum relativ redus de alcool, au un nivel plasmatic ridicat de acetaldehidă.

Determinarea experimentală a parametrilor cinetici

Pentru determinarea parametrilor cinetici se utilizează formele liniarizate ale relaţiei Michaelis-Menten. Cel mai frecvent se utilizează relaţia Lineweaver-Burk (1.27), obţinută prin dubla inversare a relaţiei 1.26.

$$\frac{1}{v}=\frac{V_{max}}{K_M}\times\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}} \qquad (1.27)$$

Prin reprezentarea grafică a valorilor experimentale 1/v (obţinute la diferite concentraţii ale substratului) în funcţie de valorile 1/[S] se obţine o dreaptă (fig.1.38) cu panta egală cu K_M/V_{max}, care intersectează ordonata în punctul care corespunde valorii $1/v=1/V_{max}$ şi abscisa în punctul care corespunde valorii $-1/[S]= -1/K_M$.

"Turn-over number" şi constanta de specificitate

"Turn-over number" notat k_{cat}, reprezintă numărul maxim de moli de substrat care pot fi convertiţi în produs, în fiecare secundă, per mol de enzimă (sau per mol de centru activ în cazul în care enzima are mai mulţi centrii activi).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

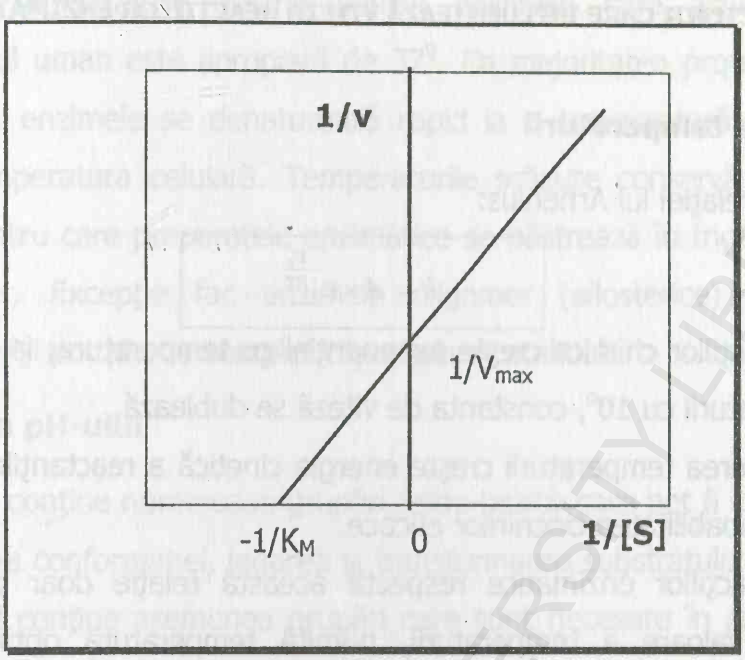


FIGURA 1.38.
Reprezentarea grafică a relaţiei Lineweaver-Burk

Deoarece viteza maximă se obţine la concentraţii mari de substrat, când toţi centrii activi ai enzimei sunt ocupaţi cu substrat, k_{cat} este un indicator al rapidităţii enzimei când toţi centrii activi sunt ocupaţi. Valoarea k_{cat} este dată de relaţia 1.28.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[ES]} \qquad (1.28)$$

În condiţii fiziologice, enzimele nu operează la concentraţii saturante ale substratelor. În general, raportul $[S]/K_M$ se situează în domeniul 0,01-1. La aceste concentraţii viteza este aproximativ egală cu $V_{max}[S]/K_M$. În aceste condiţii, numărul de moli de substrat convertiţi în produs per secundă, per mol de enzimă este egal cu $(V_{max}[S]/K_M)/[E_t]$, respectiv $(k_{cat}/K_M)[S]$. Raportul k_{cat}/K_M, se numeşte *constantă de specificitate*, şi este o măsură a rapidităţii enzimei la concentraţii mici ale substratului.

BCU "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

Influenţa temperaturii

Conform relaţiei lui Arhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

viteza reacţiilor chimice creşte exponenţial cu temperatura; la o creştere a temperaturii cu 10°, constanta de viteză se dublează.

Prin creşterea temperaturii creşte energia cinetică a reactanţilor şi astfel creşte probabilitatea ciocnirilor eficace.

Viteza reacţiilor enzimatice respectă această relaţie doar până la o anumită valoare a temperaturii, numită temperatură optimă. Peste această temperatură viteza scade brusc datorită denaturării termice a apoenzimei. Ca urmare, prin reprezentarea grafică a vitezei în funcţie de temperatură se obţine o curbă în formă de clopot (fig. 1.39).

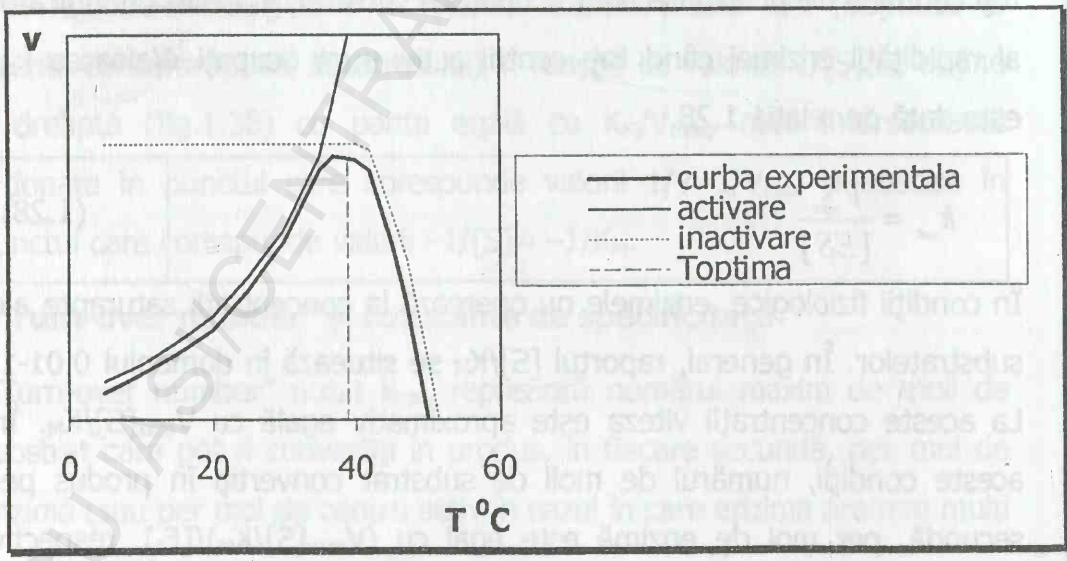


FIGURA 1.39.
Efectul temperaturii asupra vitezei reacţiilor enzimatice

Valoarea temperaturii optime pentru enzimele care acţionează în organismul uman este apropiată de 37^0. Ca majoritatea proteinelor din organism, enzimele se denaturează rapid la o temperatură cu $10\text{-}15^0$ peste temperatura celulară. Temperaturile scăzute conservă enzimele, motiv pentru care preparatele enzimatice se păstrează în frigider sau în congelator. Excepţie fac enzimele oligomer (allosterice) care prin congelare îşi pot pierde complet capacitatea catalitică.

Influenţa pH-ului

O enzimă conţine numeroase grupări acido-bazice care pot fi implicate în stabilizarea conformaţiei, legarea şi transformarea substratului. Uneori şi substratul conţine asemenea grupări care sunt necesare în procesul de legare la centrul activ al enzimei. Gradul de disociere a gruparilor acido-bazice este dependent de pH. Ca urmare este normal ca pH-ul să influenţeze viteza reacţiilor catalizate de enzime. Prin reprezentarea grafică a vitezei în funcţie de pH se obţine o curbă în formă de clopot asimetric (fig.1.40).

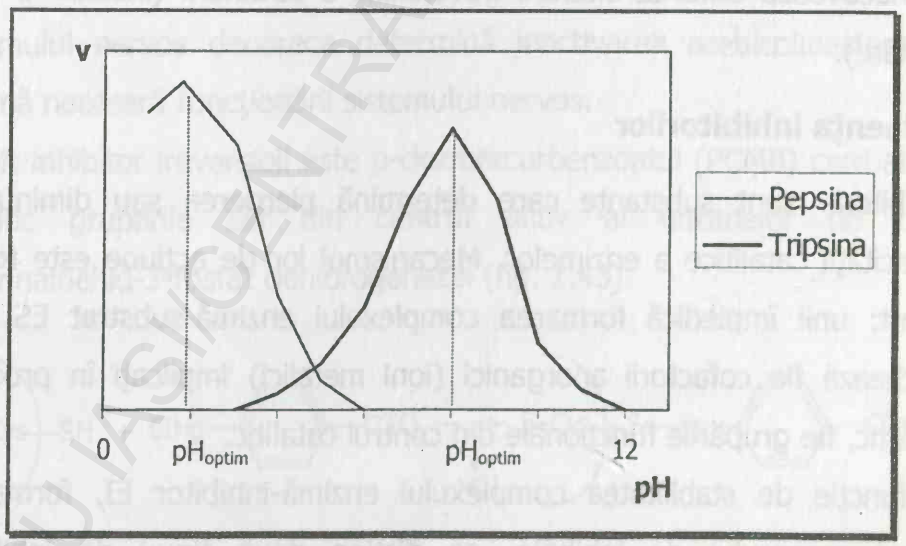


FIGURA 1.40.
Efectul pH-ului asupra vitezei reacţiilor enzimatice

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Viteza maximă corespunde pH-ului la care atât enzima cât şi substratul se găsesc în forma adecvată (fig. 1.41).

$$EH \underset{}{\overset{K_{a1}}{\rightleftharpoons}} E^- + H^+ \qquad SH^+ \overset{K_{a2}}{\rightleftharpoons} S + H^+$$

$$pK_{a1} < pH_{optim} < pK_{a2}$$

$$E^- + SH^+ \longrightarrow ESH$$

FIGURA 1.41.
pH-ul influenţează legarea substratului la centrul activ al enzimei

Pentru enzimele plasmatice pH-ul optim este apropiat de pH-ul fiziologic (pH=7,3). Pentru enzimele care acţionează în tubul digestiv pH-ul optim este fie foarte acid (ex. pH-ul optim al pepsinei este aproximativ 2), fie alcalin (ex. pH-ul optim al tripsinei este egal cu 8). Enzimele intracelulare au pH-ul optim apropiat de 7, cu excepţia enzimelor lizozomale care au pH-ul optim acid.

La valori extreme ale pH-ului (pH>10 sau pH<2), majoritatea enzimelor se inactivează datorită alterării ireversibile a structurii (inclusiv a celei primare).

Influenţa inhibitorilor

Inhibitorii. sunt substanţe care determină pierderea sau diminuarea capacităţii catalitice a enzimelor. Mecanismul lor de acţiune este foarte diferit: unii împiedică formarea complexului enzimă-substrat ES, alţii blochează fie cofactorii anorganici (ioni metalici) implicaţi în procesul catalitic, fie grupările funcţionale din centrul catalitic.

În funcţie de stabilitatea complexului enzimă-inhibitor EI, format în cursul procesului de inhibiţie, se disting două tipuri de inhibiţie: ireversibilă şi reversibilă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Inhibiţia ireversibilă se datorează formării unui complex EI nedisociabil. Acest tip de inhibiţie se accentuează progresiv până la abolirea completă a activităţii enzimatice şi nu poate fi înlăturată prin îndepărtarea inhibitorului din mediul de reacţie.

Inhibitorii de acest tip sunt în general agenţi chimici capabili să modifice covalent grupările funcţionale din centrul catalitic, îndeosebi grupările OH şi SH. De exemplu, diizopropilfluorfosfatul (DIPFP) reacţionează cu gruparea OH a serinei din centrul activ al serin proteazelor şi determină inhibarea lor ireversibilă (fig.1.42).

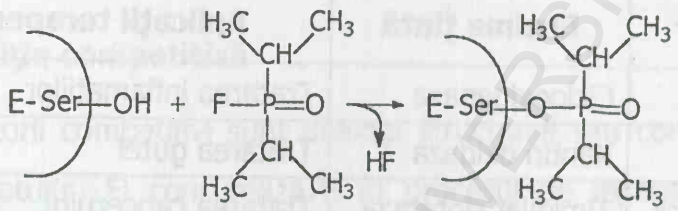


FIGURA 1.42.
Mecanismul inhibiţiei serin proteazelor cu diizopropilfluorfosfat

DIPFP face parte din grupul organofosforicelor cu acţiune toxică asupra sistemului nervos deoarece determină inactivarea acetilcolinesterazei, enzimă necesară funcţionării sistemului nervos.

Un alt inhibitor ireversibil este p-clormercurbenzoatul (PCMB) care atacă specific grupările SH din centrul activ al enzimelor de tipul glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenazei (fig. 1.43).

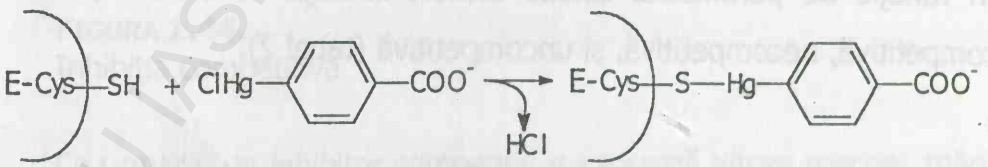


FIGURA 1.43.
Mecanismul inhibiţiei glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenazei cu PCMB

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Inhibitorii ireversibili pot fi chiar de natură proteică, caz în care formează cu enzima un complex EI rigid, practic nedisociabil. De exemplu anticorpii sintetizaţi ca răspuns la injecţiile parenterale cu enzime (antigeni), sau inhibitorii proteici ai serin proteazelor (serpine).

Efectul unor medicamente se bazează pe inhibiţia specifică, ireversibilă a unor enzime (tabel 1).

TABEL 1.
Exemple de inhibitori ireversibili utilizaţi ca medicamente

Inhibitor	Enzima ţintă	Aplicaţii terapeutice
Aspirina	Ciclooxigenaza	Tratarea inflamaţiilor
Allopurinol	Xantin oxidaza	Tratarea gutei
5-Fluorouracil	Timidilat sintetaza	Tratarea cancerului

Inhibiţia reversibilă se datorează formării unui complex EI disociabil:

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

Reacţia de formare a complexului EI este reversibilă şi este caracterizată de constanta de echilibru K_i. Complexul EI poate fi descompus prin îndepărtarea inhibitorului din mediul de reacţie, respectiv prin deplasarea echilibrului spre stânga.

În funcţie de parametrul cinetic afectat inhibiţia reversibilă poate fi: competitivă, necompetitivă, şi uncompetitivă (tabel 2).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL 2
Tipuri de inhibiţie reversibilă

Tipul inhibiţiei	Interacţiuni enzimă-inhibitor	Efectul asupra	
		K_M	Vmax
Competitivă	$E + S \rightleftharpoons E\text{-}S$	Creşte	-
Necompetitivă	$E + S \rightleftharpoons E\text{-}S$ $E\text{-}I + S \rightleftharpoons I\text{-}E\text{-}S$ $E\text{-}S + I \rightleftharpoons I\text{-}E\text{-}S$	-	Scade
Uncompetitivă	$E\text{-}S + I \rightleftharpoons I\text{-}E\text{-}S$	Scade	Scade

✓ Inhibiţia competitivă

Inhibitorii competitivi sunt analogi structurali sau conformaţionali ai substratului. Ei concurează S în procesul de legare la centrul de legare, dar nu suferă transformări chimice sub acţiunea E (fig. 1.44).

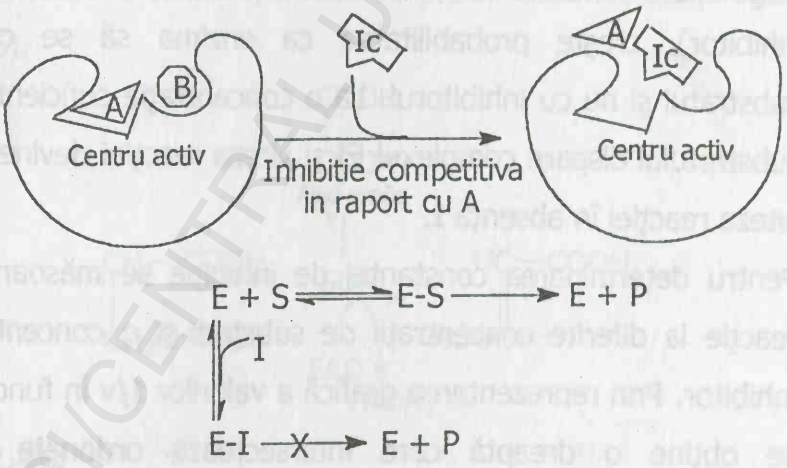


FIGURA 1.44.
Inhibiţia competitivă

Ca urmare, un inhibitor competitiv micşorează viteza reacţiei, mărind valoarea K_M. Altfel spus, în prezenţa inhibitorului competitiv este necesară o concentraţie mai mare de substrat pentru a atinge V_{max}.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Afinitatea enzimei pentru inhibitor este dată de constanta de inhibiţie K_I care reprezintă constanta de echilibru a reacţiei de formare a complexului EI:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \qquad (1.29)$$

Cu cât K_i are o valoare mai mică mică, cu atât afinitatea enzimei pentru I este mai mare şi scade mai mult afinitatea pentru substrat.

Afinitatea pentru substrat în prezenţa inhibitorului K_M' depinde de K_M şi K_i, în conformitate cu relaţia:

$$K_M' = K_M\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right) \qquad (1.30)$$

Indiferent cât de mare este afinitatea enzimei pentru inhibitor, dacă se adaugă din ce în ce mai mult substrat (la o concentraţie fixă de inhibitor), creşte probabilitatea ca enzima să se combine cu substratul şi nu cu inhibitorul. La o concentraţie suficient de mare a substratului dispare complexul EI şi viteza reacţiei devine identică cu viteza reacţiei în absenţa I.

Pentru determinarea constantei de inhibiţie se măsoară viteza de reacţie la diferite concentraţii de substrat şi o concentraţie fixă e inhibitor. Prin reprezentarea grafică a valorilor 1/v în funcţie de 1/[S] se obţine o dreaptă care intersectează ordonata în punctul corespunzător valorii $1/V_{max}$, şi abscisa în punctul corespunzător valorii $-1/K_M'$ (fig. 1.45).

BCU "ASACHI" IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

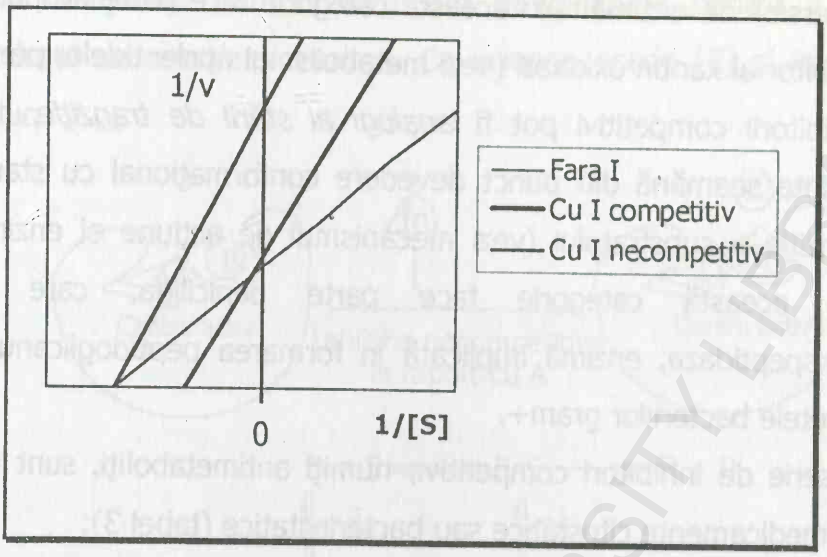


FIGURA 1.45.
Reprezentarea Lineweaver-Burk în absenţa şi în prezenţa inhibitorilor

Un exemplu de inhibitor competitiv este acidul oxalic care, fiind analog al acidului succinic, inhibă reversibil succinat dehidrogenaza (fig. 1.46).

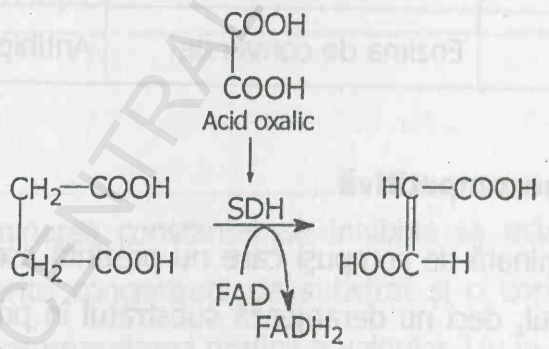


FIGURA 1.46.
Reacţia catatalizată de succinat dehidrogenază

Unii inhibitori, numiţi *inhibitori suicid*, după ce s-au legat la centrul activ al enzimei sunt transformaţi în compuşi reactivi care se leagă

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ireversibil de enzimă. Din această categorie face parte allopurinolul, inhibitor al xantin oxidazei (vezi metabolismul nucleotidelor purinice). Inhibitorii competitivi pot fi *analogi ai stării de tranziţie*, cu alte cuvinte seamănă din punct devedere conformaţional cu starea de tranziţie a substratului (vezi mecanismul de acţiune al enzimelor). Din această categorie face parte penicilina, care inhibă transpeptidaza, enzimă implicată în formarea peptidoglicanului din peretele bacteriilor gram+.

O serie de inhibitori competitivi, numiţi antimetaboliţi, sunt utilizaţi ca medicamente citostatice sau bacteriostatice (tabel 3).

TABEL 3.
Inhibitori competitivi utilizaţi ca medicamente

Inhibitor	Enzima ţintă	Aplicaţii terapeutice
Sulfanilamida	Dihidropteroat sintetaza	Bacteriostatic
Metotrexat	Dihidrofolat reductaza	Tratarea leucemiei
Captopril	Enzima de conversie	Antihipertensiv

✓ **Inhibiţia necompetitivă**

Este determinată de compuşi care nu prezintă asemănări structurale cu substratul, deci nu deranjează substratul în procesul de legare la centrul de legare al enzimei (fig. 1.47). Ca urmare, scad viteza maximă, fără să afecteze afinitatea enzimei pentru substrat. Deoarece inhibitorul are un centru de legare diferit de centrul de legare a substratului (fig. 1.47), este posibilă atât formarea unui complex enzimă-inhibitor (EI) cât şi a unui complex ternar enzimă-inhibitor-substrat (ESI). Practic, inhibitorul deformează enzima astfel

BCU "AS" CENTRAL UNIVERSITY IBRARY

încât complexul ESI nu se poate descompune pentru a elibera produsul de reacţie şi enzima. Ca urmare, scade [E] şi implicit se reduce V_{max}.

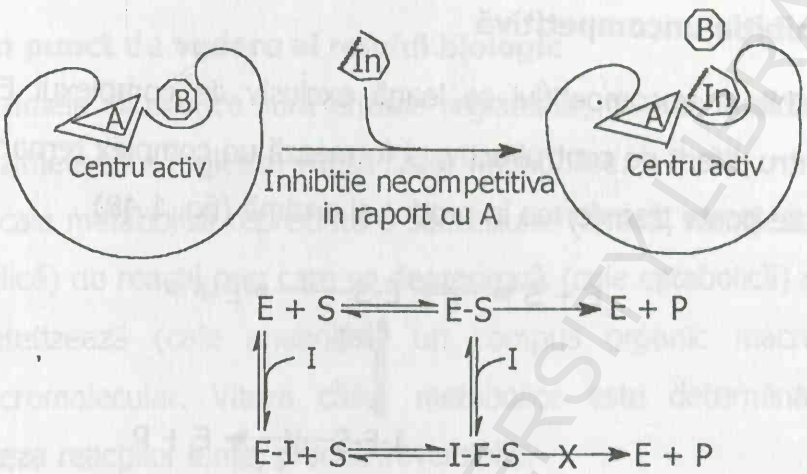


FIGURA 1.47.
Inhibiţia necompetitivă

Viteza maximă în prezenţa inhibitorului, notată V_{max}', este legată de V_{max} şi K_i prin relaţia:

$$V_{max}' = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \qquad (1.31)$$

Pentru determinarea constantei de inhibiţie se măsoară viteza de reacţie la diferite concentraţii de substrat şi o concentraţie fixă e inhibitor. Prin reprezentarea grafică a valorilor 1/v în funcţie de 1/[S] se obţine o dreaptă care intersectează ordonata în punctul corespunzător valorii $1/V_{max}'$, şi abscisa în punctul corespunzător valorii $-1/K_M$ (vezi fig. 1.45).

Cel mai frecevent, inhibitorii necompetitivi sunt produşii finali ai căilor metabolice (vezi reglarea enzimelor prin inhibiţie "feed-back").

Enzimele care au ca şi cofactori anorganici ioni bivalenţi sunt

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

inhibate necompetitiv de agenţii chelatanţi de tipul EDTA (etilendiamin tetraacetat). Enzimele care au ca şi grupare prostetică hem sunt inhibate de cianuri (CN^-) şi CO.

✓ **Inhibiţia uncompetitivă**

Inhibitorii uncompetitivi se leagă exclusiv de complexul ES, la un centru diferit de centrul activ, şi formează un complex ternar ESI care nu se poate transforma în produs şi enzimă (fig. 1.48).

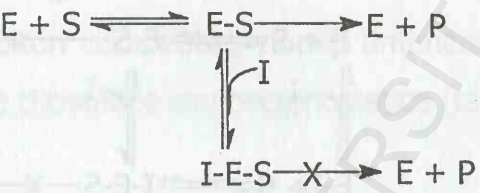


FIGURA 1.48.
Inhibiţia uncompetitivă

Inhibitorii de acest tip măresc afinitatea enzimei pentru S (echilibrul de formare a ES se deplasează către dreapta), deci micşorează valoarea K_M. Pe de altă parte, fiindcă formează un complex ESI care nu se poate transforma în P, inhibitorul determină scăderea cantităţii efective de enzimă şi implicit a vitezei maxime. Deci, în prezenţa inhibitorului uncompetitiv sunt modificaţi ambii parametrii cinetici; se obţine K_M' şi V_{max}' care sunt legaţi de K_M şi V_{max} prin relaţiile 1.30. respectiv 1.31.

Prin reprezentareagrafică a valorilor 1/v în funcţie de 1/[S] se obţine o dreaptă paralelă cu dreapta obţinută în absenţa inhibitorului.

BCU MUZICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ENZIME ALLOSTERICE

Definiţie

a) din punct de vedere al rolului biologic

Enzimele allosterice sunt enzime reglatoare, cu alte cuvinte sunt enzimele care reglează viteza căilor metabolice.

O cale metabolică reprezintă o succesiune (liniară, ramificată, sau ciclică) de reacţii prin care se degradează (cale catabolică) sau se sintetizează (cale anabolică) un compus organic macro sau micromolecular. Viteza căilor metabolice este determinată de viteza reacţiilor lente, practic ireversibile.

De exemplu glicoliza aerobă, o cale de catabolizare a glucozei formată dintr-o succesiune liniară de 10 reacţii, este reglată de enzimele: hexokinaza (HK), fosfofructo kinaza (PFK) şi piruvat kinaza (PK) care catalizează reacţiile 1,3, şi 10 (fig. 1.49).

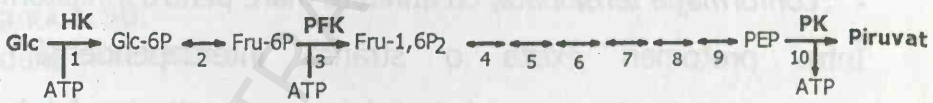


FIGURA 1.49.
Enzimele reglatoare ale glicolizei
(Glc=glucoză, Glc-6P=glucozo-6-fosfat, Fru-6P=fructozo-6-fosfat, Fru-1,6P_2=fructozo-1,6-bisfosfat; PEP=fosfoenol-piruvat)

b) din punct de vedere structural

Enzimele allosterice sunt, în general, oligomeri formaţi dintr-un număr variabil (de obicei par) de protomeri reuniţi prin legături necovalente astfel încât să rezulte o structură cuaternară simetrică. Protomerii pot fi:

BCU ASIMTAL UNIVERSITY LIBRARY

- *de acelaşi tip*, fiecare având un centru activ şi unul sau mai mulţi centrii allosterici (reglatori); *centrul allosteric* este o zonă din structura spaţială distinctă de centrul activ, de care se leagă efectorii allosterici (activatori & inhibitori);
- *de tip diferit*, catalitici (care au centru activ) şi reglatori (care au centrii allosterici).

De exemplu, piruvat kinaza hepatică este o enzimă allosterică formată din 4 protomeri identici. În schimb, protein kinaza cAMP-dependentă, este formată din 2 subunităţi catalitice şi 2 subunităţi reglatoare.

Caracteristici structurale & funcţionale

Protomerii se pot prezenta sub forma unor conformaţii diferite, interconvertibile:

- *conformaţia relaxată*, cu afinitate mare pentru substrat sau activatori;
- *conformaţia tensionată,* cu afinitate mare pentru inhibitori.

Între protomeri există o strânsă interdependenţă, numită *cooperativitate*; legarea substratului sau a activatorului la centrul activ, respectiv reglator, al unei subunităţi în stare tensionată induce modificări conformaţionale care conduc la starea relaxată. Această schimbare conformaţională (*efect allosteric*) se transmite celorlalte subunităţi. Ca urmare afinitatea celorlalţi protomeri pentru substrat sau efectori poate să crească (*cooperativitate pozitivă*) sau să scadă (*cooperativitate negativă*).

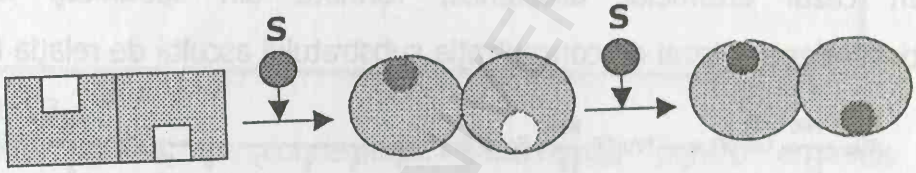
Pentru explicarea cooperativităţii au fost propuse două modele:

- simetric sau concertat
- secvenţial

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modelul simetric, propus de Monod, Wyman şi Changeux, admite că oligomerul este totdeauna simetric, deci toţi protomerii se găsesc fie în starea tensionată, fie în starea relaxată. Între cele două stări există un echilibru care poate fi deplasat prin legarea substratului sau a efectorilor. Substratul şi efectorii pozitivi (activatorii) deplasează echilibrul spre forma relaxată, iar efectorii pozitivi (inhibitorii) deplasează echilibrul spre forma tensionată (fig. 1.50).

Acest model se protiveşte mai ales enzimelor care au protomeri identici, între care se manifestă cooperativitate pozitivă.



Conformaţia T (tensionată)

Conformaţia R (relaxată)

FIGURA 1.50.
Modelul simetric

Modelul secvenţial, propus de Koshland şi colab., admite existenţa formelor hibride (protomeri în stare conformaţională diferită); legarea unui ligand (substrat, efector allosteric) la oricare dintre subunităţi induce o modificare conformaţională a acelei subunităţi care se transmite parţial subunităţilor vecine. Efectul legării ligandului este transmis secvenţial şi produce creşterea sau scăderea afinităţii protomerilor (fig. 1.51).

Acest model se potriveşte atât cooperativităţii pozitive cât şi cooperativităţii negative.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

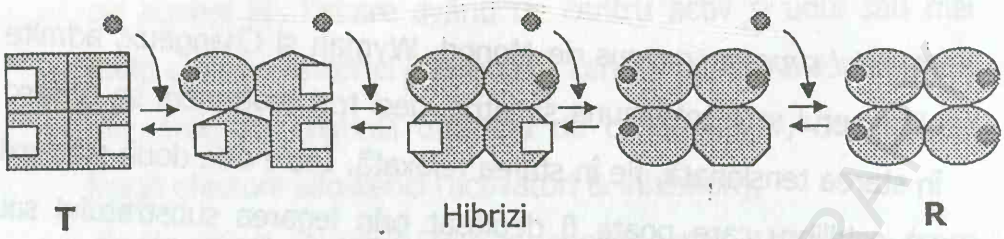
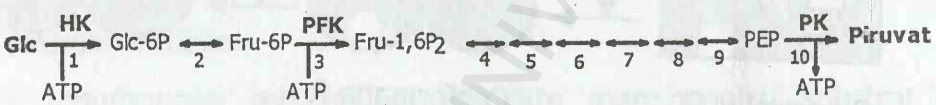


FIGURA 1.51.
Modelul secvenţial

Efectul concentraţiei substratului. Relaţia lui Hill

În cazul enzimelor allosterice, formate din subunităţi identice, dependenţa vitezei de concentraţia substratului ascultă de relaţia lui Hill:



unde n reprezintă numărul lui Hill, $K_{0,5}$ are semnificaţia K_M (deci reprezintă afinitatea enzimei pentru substrat). Numărul lui Hill poate fi pozitiv, întreg sau fracţionar, cel mult egal cu numărul centrilor catalitici. În cazul în care:

- n>1, între subunităţi există cooperativitate pozitivă;
- n=1, între subunităţi nu există cooperativitate;
- n<1, între subunităţi există cooperativitate negativă;

În cazul în care n>1, prin reprezentarea grafică a relaţiei lui Hill se obţine o curbă cu aspect sigmoidal (fig. 1.52). Aceasta ilustrează faptul că legarea substratului la primul protomer, posibilă la o anumită concentraţie a substratului, induce modificări conformaţionale care se transmit celorlalţi protomeri şi consecutiv creşte afinitatea acestora pentru substrat.

BCU SUCEAVA UNIVERSITY LIBRARY

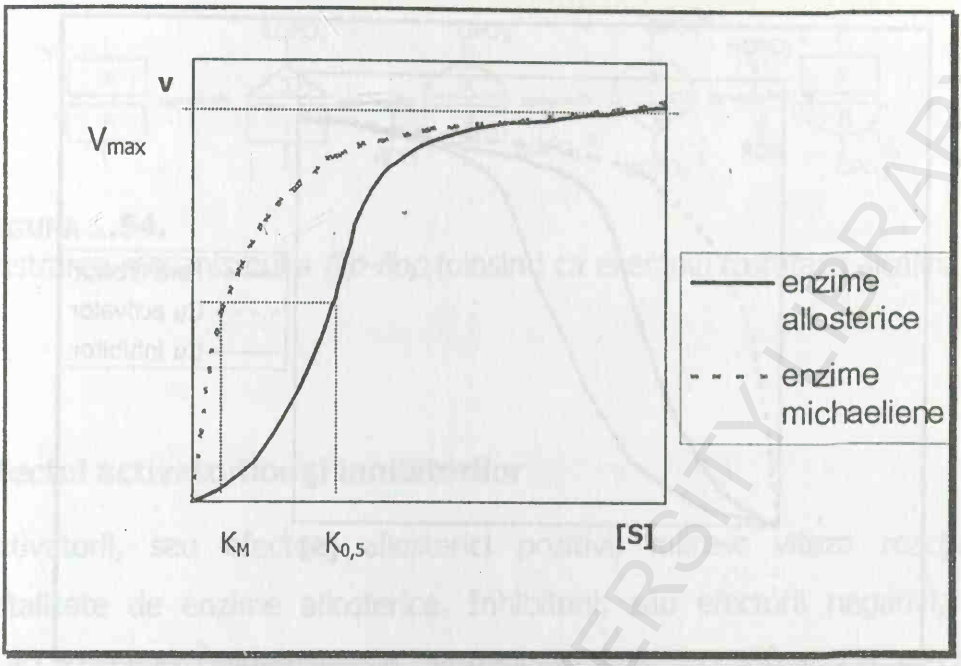


FIGURA 1.52.
Dependenţa vitezei de concentraţia substratului pentru enzimele allosterice şi michaeliene.

Spre deosebire de enzimele michaeliene, enzimele allosterice cu cooperativitate pozitivă sunt mai sensibile la variaţii mici ale concentraţiei substratului, care în mod normal se situează în vecinătatea K_M, respectiv $K_{0,5}$. Cu alte cuvinte, viteza reacţiei se modifică semnificativ la o variaţie mică a concentraţiei substratului. Acest fapt este în concordanţă cu rolul lor reglator.

În cazul în care n=1 între protomeri nu se manifestă cooperativitate. Ca urmare, curba care ilustrează dependenţa vitezei de concentraţia substratului are aspect hiperbolic (fig. 1.53).

Dacă n<1 protomerii sunt activi alternativ (mecanism *flip-flop*), şi aparent se comportă ca şi enzimele michaeliene (fig. 1.53).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

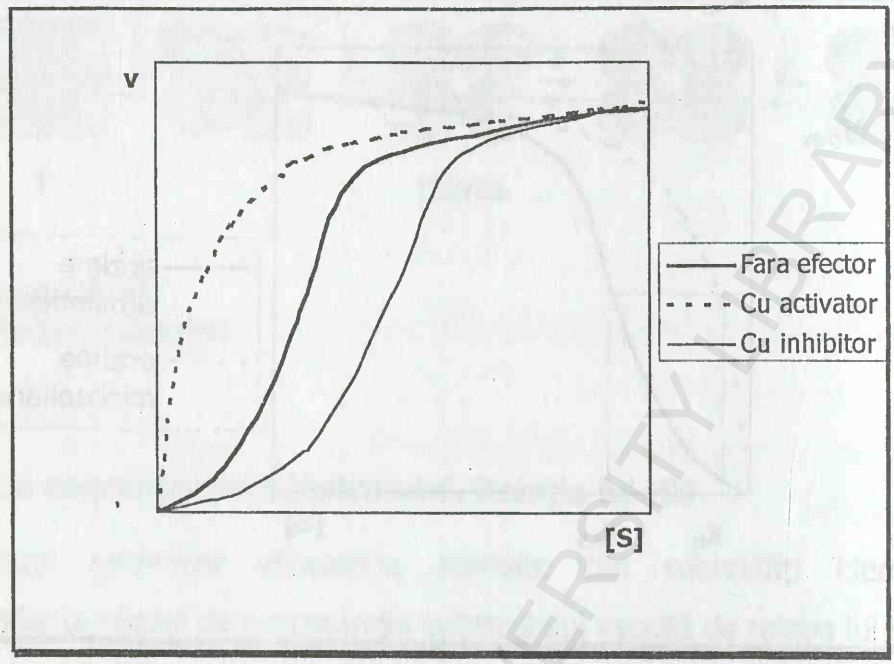


FIGURA 1.53.
Dependenţa vitezei de concentraţia substratului pentru enzimele oligomer cu cooperativitate pozitivă, fără cooperativitate, şi cu cooperativitate negativă

Un exemplu de enzimă cu cooperativitate negativă este fosfataza alcalină din *Escherichia Coli*. Această enzimă care catalizează hidroliza esterilor fosforici, este formată din 2 protomeri identici care pot exista în 3 stări conformaţionale, notate F (liberă=fără substrat), T (tensionată) şi R (relaxată). Prin fixarea substratului la centrul activ al uneia dintre subunităţi, aceasta trece în forma T şi apoi, prin transferul fosfatului pe hidroxilul Ser din centrul catalitic, suferă o nouă modificare conformaţională şi trece în forma relaxată R. În acest timp, cealaltă subunitate rămâne în forma F, deci dimerul este asimetric din punct de vedere conformaţional. După ce prima subunitate şi-a terminat acţiunea catalitică, cea de-a doua subunitate fixează o moleculă de substrat şi trece consecutiv în stările T şi R (fig. 1.54).

BCU ASISTENTA UNIVERSITY LIBRARY

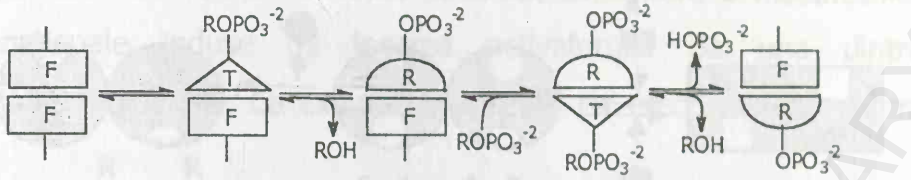


FIGURA 1.54.
Ilustrarea mecanismului *flip-flop* folosind ca exemplu fosfataza alcalină

Efectul activatorilor şi inhibitorilor

Activatorii, sau efectorii allosterici pozitivi, măresc viteza reacţiilor catalizate de enzime allosterice. Inhibitorii, sau efectorii negativi, au efect contrar. În funcţie de parametrul cinetic modificat de efectori enzimele allosterice pot fi grupate în 2 clase:

- *clasa K*, dacă efectorii modifică afinitatea enzimei pentru substrat;
- *clasa V*, dacă efectorii modifică viteza maximă.

Astfel, în cazul enzimelor de tip K, cu protomeri identici, activatorii determină deplasarea echilibrului dinspre forma tensionată, cu afinitate mică, spre forma relaxată cu afinitate mare pentru substrat (efect heterotrop pozitiv). Ca urmare, faţă de substrat enzima se va comporta ca şi o enzimă michaeliană. În schimb, inhibitorii determină deplasarea echilibrului spre forma tensionată, cu afinitate scăzută pentru substrat (efect heterotrop negativ). Influenţa efectorilor asupra enzimelor de tip K poate fi ilustrată folosind modelul simetric (fig. 1.55), şi reprezentările grafice din figura 1.56.

BCU "ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

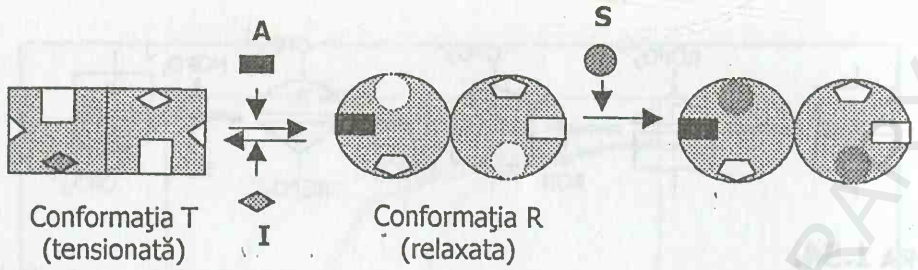


FIGURA 1.55.
Efectul activatorului şi inhibitorului asupra enzimelor de tip K

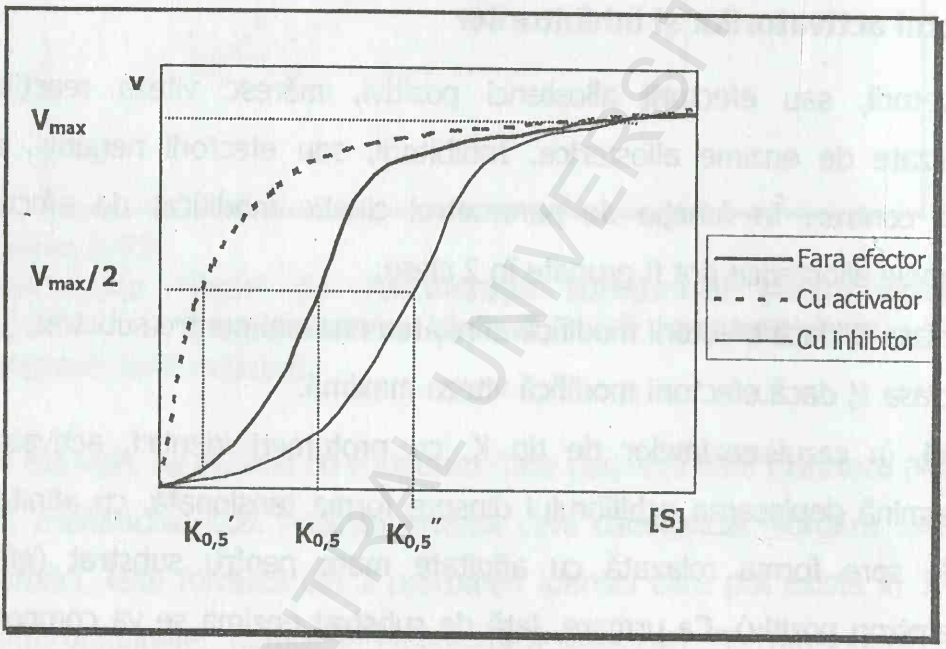


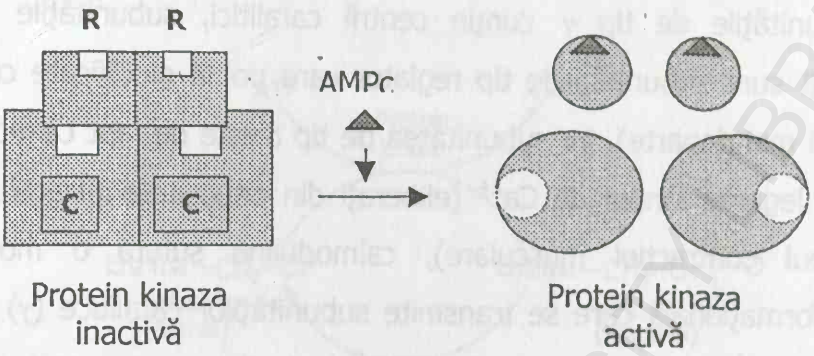
FIGURA 1.56.
Efectul activatorului şi inhihibitorului asupra enzimelor allosterice de tip K

O astfel de enzimă allosterică (de tip K) este piruvat kinaza hepatică. Printre activatorii ei se numără fructozo-1,6-bisfosfatul ("forward activation"), iar printre inhibitori se numără ATP, produs al glicolizei ("feedback inhibition").

În cazul *enzimelor allosterice cu protomeri diferiţi*, catalitici (C) şi reglatori (R), activarea este sinonimă cu "eliberarea" subunităţilor

BCU ASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

catalitice" sau "dezvelirea" centrilor catalitici, ca urmare a modificărilor conformaţionale induse de legarea activatorului de una dintre subunităţile reglatoare. Ca exemplu, se poate da efectul cAMP asupra



Protein kinaza inactivă

Protein kinaza activă

protein kinazei (fig. 1.57).

FIGURA 1.57.
Activarea protein kinazei de către cAMP
Legarea cAMP de subunitătile reglatoare induce modificări conformaţionale şi, succesiv eliberarea & activarea subunitătilor catalitice.

Alte modalităţi de reglare

Activitatea enzimelor allosterice poate fi modificată prin interacţiunea cu alte proteine, sau prin modificare covalentă reversibilă

- **Interacţiunea cu alte proteine**

  Unele enzime, ca de exemplu fosforilaz kinaza musculară, protein kinaza Ca^{2+}-calmodulin dependentă, miozin kinaza, Ca^{2+}-ATP-aza, pot fi activate prin intermediul calmodulinei, o proteină mică (GM=17000) existentă în toate celulele eucariote.

BCU "ASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fosforilaz kinaza musculară este formată din 4 subunităţi diferite, notate $\alpha, \beta, \gamma, \delta$, care se asociază pentru a forma un tetramer $(\alpha, \beta, \gamma, \delta)_4$.

Subunităţile de tip γ conţin centrii catalitici, subunităţile de tip α şi β sunt subunităţi de tip reglator care pot fi modificate covalent (vezi mai departe), iar subunitatea de tip δ este de fapt calmodulina. Prin legarea ionilor de Ca^{2+} (eliberaţi din depozitele intracelulare în timpul contracţiei musculare), calmodulina suferă o modificare conformaţională care se transmite subunităţilor catalitice (γ) şi este sinonimă cu activarea fosforilaz kinazei. Ca urmare, este iniţiată hidroliza glicogenului, proces prin care se formează glucoză, suportul energetic al contracţiei.

- **Modificare covalentă reversibilă**

O serie de enzime allosterice formate din subunităţi diferite sunt activate sau inactivate prin ataşarea unor grupări chimice de subunităţile reglatoare. Această modificare este reversibilă deoarece pentru fiecare enzimă responsabilă de ataşarea unei anumite grupări există o altă enzimă responsabilă de desprinderea aceleiaşi grupări. Bineînţeles că aceste enzime funcţionează în contratimp.

Cea mai frecventă modificare covalentă reversibilă este fosforilarea grupării hidroxil din Ser (cel mai des), Thr, Tyr. Introducerea şi îndepărtarea grupării fosfat este catalizată de protein kinază, respectiv de protein fosfatază (fig. 1.58).

La organismele eucariote fosforilarea este utilizată pentru reglarea a sute de enzime dintre care o parte sunt prezentate în tabelul 1.

Aceste enzime sunt fosforilate sau defosforilate ca raspuns la semnalele extracelulare transmise de hormoni (ex. adrenalina,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

glucagon, insulină) sau de factori de creştere. De exemplu, adrenalina, un hormon secretat de medulo-suprarenală, determină activarea protein kinazei cAMP-dependentă.

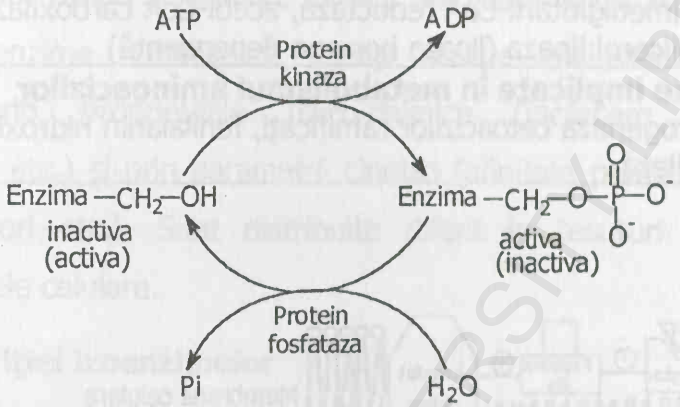


FIGURA 1.58.
Fosforilarea reversibilă a enzimelor allosterice

Aceasta fosforilează o serie de enzime printre care se numără fosforilaz kinaza şi glicogen sintetaza. Prin fosforilare fosforilaz kinaza se activează iar glicogen sintetaza se inactivează (devine sensibilă la acţiunea inhibitorilor). La rândul ei fosforilaz kinaza activează, prin fosforilare, glicogen fosforilaza. Ca rezultat are loc transformarea glicogenului în glucozo-1-fosfat (fig. 1.59).

Deci, fosforilarea asigură funcţionarea în contratimp a glicogenolizei şi a glicogenosintezei, căi antagonice localizate în acelaşi compartiment celular (citosol).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL 4.

Enzime allosterice reglate prin fosforilare

Enzime implicate în metabolismul glucidic Glicogen fosforilaza, fosforilaz kinaza, glicogen sintetaza, fosfofructokinaza-2, piruvat kinaza, piruvat dehidrogenaza
Enzime implicate în metabolismul lipidic Hidroximetilglutaril-CoA reductaza, acetil-CoA carboxilaza, triacilglicerol lipaza (lipaza hormon dependentă)
Enzime implicate în metabolismul aminoacizilor Dehidrogenaza cetoacizilor ramificaţi, fenilalanin hidroxilaza, tirozin hidroxilaza

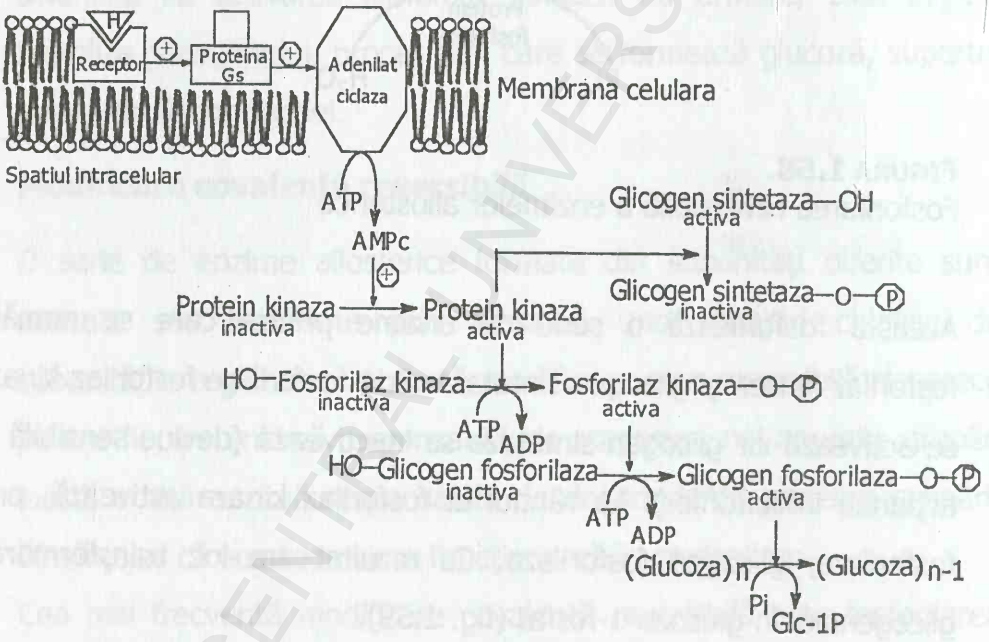


FIGURA 1.59.

Reglarea prin fosforilare, declanşată de adrenalină, a enzimelor reglatoare din glicogenoliză şi glicogenosinteză.

Complexul adrenalină-receptor β -adrenergic activează proteina G_s, care la rândul ei activează adenilat ciclaza. Ca urmare, are loc transformarea ATP intracelular în AMPc, activatorul protein kinazei.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IZOENZIME

Definiţie

Izoenzimele sunt forme moleculare diferite sau, altfel spus, sunt izomeri ai aceleiaşi enzime. Catalizează aceaşi reacţie enzimatică dar se deosebesc prin proprietăţile fizico-chimice (încărcare electrică, termolabilitate etc.) şi prin parametrii cinetici (afinitate pentru substrat, pentru inhibitori etc.). Sunt distribuite diferit în ţesuturi şi/sau în compartimentele celulare.

Cauzele apariţiei izoenzimelor

- *Existenţa unor gene similare în nucleu şi mitocondrii*

  Prin exprimarea acestor gene rezultă izoenzime genetic independente, cu localizare celulară diferită. De exemplu malat dehidrogenaza mitocondrială şi citoplasmatică.

- *Existenţa genelor alele*

  Prin exprimarea diferită a genelor alele pot rezulta izoenzime (monomerice sau oligomerice) care se deosebesc relativ puţin prin structura primară (datorită diferenţelor minime existente în secvenţa genelor). De exemplu variantele genetice ale glucozo 6-fosfat dehidrogenazei.

- *Lipsa unui fragment terminal din lanţul polipeptidic*

  Unele enzime monomer, ca de exemplu anhidraza carbonică şi hexokinaza, au izoenzime care se deosebesc prin lungimea lanţului polipeptidic. Formarea izoenzimelor lor este determinată fie de citirea greşită a singurei gene care codifică enzima, fie de clivarea post

BCU "IOAN SLAVICI" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

translaţională a unui fragment din lanţul polipeptidic (de exemplu familia chimotripsinelor derivate prin clivarea chimotripsinogenului).

- *Gradul diferit de polimerizare a singurului tip de monomer*

  Frecvent mai multe lanţuri, de acelaşi tip, se asociază pentru a forma enzima funcţională. În felul acesta pot rezulta mai multe izoenzime care se deosebesc prin gradul de polimerizare. Aşa se explică existenţa izoenzimelor glutamat dehidrogenazei (GM=$25x10^4$ şi $1x10^6$)

- *Existenţa mai multor tipuri de monomeri, care se pot asocia în mai multe feluri*

  Enzimele codificate de mai multe gene sunt enzime formate din subunităţi diferite. Tipul de asociere a monomerilor este dependent de intensitatea exprimării genelor (diferită de la un tip de celulă la alt tip de celulă). Diferenţele între secvenţa monomerilor sunt minime astfel că, indiferent de compoziţia heteropolimerului, nu se modifică specificitatea de reacţie a enzimei. De exemplu lactat dehidrogenaza este formată din două tipuri de subunităţi:

  - tipul "M" existent preponderent în muşchi şi ficat,
  - tipul "H" existent preponderent în miocard.

  Prin asociere câte 4 a acestor tipuri de subunităţi rezultă 5 hibrizi: M_4, M_3H, M_2H_2, MH_3, H_4 care catalizează aceaşi reacţie (dehidrogenarea reversibilă a acidului lactic) ..

Distribuţia izoenzimelor

Izoenzimele sunt distribuite diferit la nivelul ţesuturilor şi a compartimentelor celulare. De exemplu, în ficat predomină lactat dehidrogenaza de tip M_4 şi M_3H, iar în miocard predomină izoenzima de tip H_4. Pe distribuţia tisulară diferită a izoenzimelor se bazează

BCU IAŞI "GR. T. POPA" UNIVERSITY LIBRARY

semiologia enzimatică (utilizarea izoenzimelor în scop diagnostic). Majoritatea enzimelor au o distribuţie tisulară largă dar distribuţia celulară este unică; sunt localizate fie în citosol, fie într-unul din organitele celulare (lizozomi, mitocondrii etc.). Ele pot fi utilizate ca enzime marker în procesul de izolare a organitelor celulare (vezi tabel 5).

TABEL 5. Enzime marker

Denumirea organitului celular	**Denumirea enzimei**
Nucleu	ADN-polimeraza
Mitocondrii	Monoamino-oxidaza Succinat dehidrogenaza
Lizozomi	5'-Nucleotidaza acidă β-Glucuronidază Catepsine
Microzomi	Glucozo-6-fosfataza
Membrane plasmatice	5'-Nucleotidaza bazică NADH-citocrom C reductaza
Citosol	Lactat dehidrogenaza

Există enzime cu localizare celulară dublă. De exemplu malat dehidrogenaza, aspartat aminotransferaza, izocitrat dehidrogenaza au izoenzime citosolice şi mitocondriale. Acestea pot fi diferenţiate prin tehnici imunochimice. Prezenţa în ser a izoenzimelor mitocondriale demonstrează prezenţa leziunilor celulare şi implică un prognostic mai rezervat în tratarea bolilor hepatice şi a infarctului miocardic.

BCU "IOAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ACTIVITATEA ENZIMATICĂ

Definiţie

În biochimie, biologie moleculară şi semiologie biochimică este indispensabilă măsurarea concentraţiei enzimelor din diferite medii (celule, fracţiuni subcelulare, efluent cromatografic, ser sanguin, etc.). Aceasta se poate exprima în moli, grame sau miligrame de enzimă per grame sau litru de material biologic. În general, pentru a putea determina concentraţia unei enzime aceasta trebuie să fie mai întâi izolată, purificată şi apoi dozată prin metode laborioase. Deoarece enzimele sunt prezente de obicei în cantităţi foarte mici în lichidele biologice şi sunt dificil de izolat se preferă măsurarea activităţii catalitice şi corelarea acesteia cu concentraţia. Practic se măsoară viteza maximă, respectiv parametrul cinetic care variază proporţional cu concentraţia enzimei.

Activitatea enzimatică reprezintă cantitatea de enzimă care, în condiţii standard, transformă o anumită cantitate de substrat într-un anume interval de timp.

Activitatea specifică reprezintă numărul de micromoli de substrat transformaţi, în condiţii standard, de un miligram de enzimă per minut.

Activitatea moleculară (sau "turnover number") reprezintă numărul de molecule de substrat transformate, în condiţii standard, de o moleculă de enzimă per minut.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Unităţi de măsură

Conform recomandărilor emise în 1958 de către Comisia de Enzime a Uniunii Internaţionale de Biochimie (IUB) activitatea enzimatică se exprimă în unităţi internaţionale. O *unitate internaţională (UI)* reprezintă *cantitatea de enzimă care catalizează, în condiţii standard (de pH, temperatură, forţă ionică), transformarea unui micromol de substrat per minut*. Mai recent, la sugestia unor Comisii de normalizare, s-a introdus o nouă unitate enzimatică numită katal. Un *katal (kat)* reprezintă *cantitatea de enzimă care catalizează transformarea unui mol de substrat per secundă*. Datorită cifrelor enorme obţinute prin exprimarea activităţii în katali s-a recurs la exprimarea în *microkatali* ($\mu kat=10^{-6}kat$), *nanokatali* ($nkat=10^{-9}kat$) şi *picokatali* ($pkat=10^{-12}kat$). O unitate internaţională corespunde la 1/60 μkat sau 16,67 nkat.

În mod convenţional se exprimă "concentraţia enzimei" în unităti de activitate enzimatică per unitate de volum de lichid biologic, respectiv UI/L sau mU/mL.

Pentru evaluarea gradului de puritate a unei enzime se recomandă exprimarea activităţii specifice în unităţi internaţionale per miligram de proteină, respectiv katali per kilogram de proteină sau katali per mol de enzimă.

Determinarea activităţii

Determinarea activităţii enzimatice este sinonimă cu determinarea vitezei de reacţie. Practic, se pun în contact, un anume interval de timp, un număr limitat de molecule de enzimă cu un mare exces de molecule de substrat ($[S]>10K_M$), în condiţii standardizate de pH, temperatură şi forţă ionică. În asemenea condiţii cinetica reacţiei este de ordinul zero în

raport cu concentraţia substratului şi de ordinul unu în raport cu concentraţia enzimei ($v = v_{max} = k_2[E]$). În final se urmăreşte fotometric fie creşterea concentraţiei produsului de reacţie sau a coenzimei modificate, fie scăderea concentraţiei substratului sau coenzimei.

În cazul în care unul dintre reactanţii sau produşii reacţiei prezintă un maxim de absorbţie caracteristic (în domeniul vizibil sau ultraviolet) se utilizează o "metodă cinetică" (se urmăreşte mersul reacţiei fără întrerupere, folosind spectrofotometre cu înregistrator). De exemplu dacă enzima este NAD^+ dependentă, se urmăreşte continuu variaţia absorbţiei caracteristice NADH (λ=340nm). Dacă nici reactanţii, nici produşii reacţiei nu prezintă maxime caracteristice de absorbţie se utilizează substrate sintetice (analogi de substrate) sau se cuplează reacţia enzimatică cu o altă reacţie enzimatică. Cu alte cuvinte, produsul reacţiei enzimatice devine substrat pentru o altă enzimă (indicator) care de obicei este NAD^+ dependentă. Dacă acest lucru nu este posibil atunci se utilizează "determinarea în două puncte". În acest caz, după un timp fix de incubare enzima se inactivează, şi apoi produsul reacţiei este dozat pe baza unei reacţii de culoare. De exemplu, pentru determinarea activităţii alanin transaminazei (ALAT) piruvatul format prin reacţia enzimatică poate fi dozat folosind ca enzimă cuplantă lactat dehidrogenaza (NAD^+ dependentă) sau reactivul de culoare 2,4-dinitro-fenilhidrazină.

Sunt de preferat metodele cinetice doarece permit observarea abaterilor de la cinetica de ordinul zero în raport cu concentraţia substratului, respectiv de ordinul unu în raport cu concentraţia enzimei.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

REGLAREA VITEZEI REACŢIILOR ENZIMATICE

Organismele vii îşi pot autoregla metabolismul controlând atât concentraţia cât şi activitatea enzimelor.

CONTROLUL CONCENTRAŢIEI ENZIMELOR

Concentraţia sau cantitatea absolută a unei enzime depinde de echilibrul dintre viteza de sinteză şi viteza de degradare (fig. 1.60).

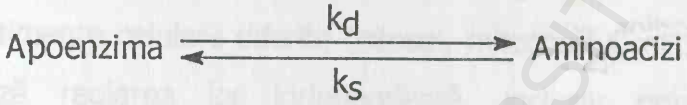


FIGURA 1.60.
Cantitatea de enzimă depinde de echilibrul dintre sinteză şi degradare

Cantitatea de enzimă poate să crească când creşte viteza de sinteză (k_s) sau când scade viteza de degradare (k_d). Similar, cantitatea de enzimă poate să scadă prin reducerea sintezei sau prin intensificarea degradării. Sinteza şi degradarea proteinelor sunt procese distincte, catalizate de seturi diferite de enzime care la rândul lor sunt reglate independent.
Sinteza proteinelor este reglată la nivelul transcrierii şi traducerii. Enzimele a căror concentraţie creşte ca urmare a prezenţei inductorului (ex. substratul enzimei, hormon) fac parte din familia enzimelor inductibile (fig. 1.61). Din această familie fac parte o serie de enzime implicate în metabolismul aminoacizilor, glucidelor, lipidelor, nucleotidelor. Concentraţia acestor enzime depinde de natura dietei şi de nivelul unor hormoni (tabel 6). Inducţia nu au caracter permanent; pentru aceaşi enzimă inducţia poate fi urmată de represie datorită creşterii concentraţiei represorului sau a corerepresorului (care poate fi chiar produsul enzimei).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

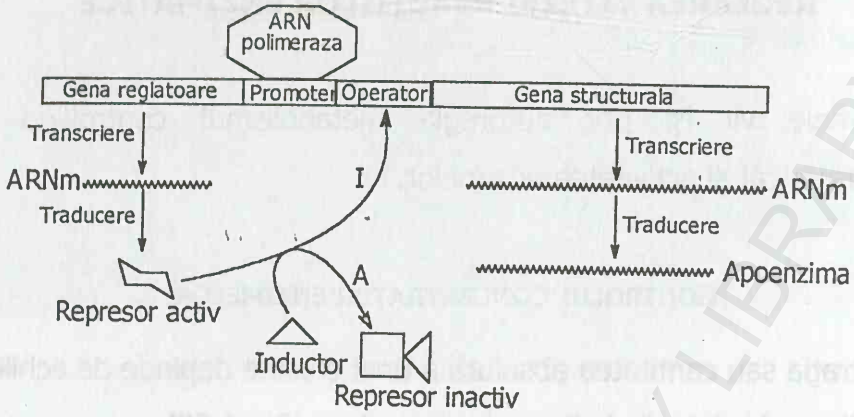


FIGURA 1.61.
Efectul inductorilor

TABEL 6.
Exemple de enzime hepatice inductibile

Enzime	Stimul
Metabolismul aminoacizilor	
Transaminaze	Dietă bogată în proteine, săracă în glucide Hormoni glucocorticoizi insulină, glucagon
Metabolismul glucidelor	
Glucokinaza Piruvat kinaza	Dietă bogată în glucide Insulina
Metabolismul lipidelor	
Fosfatidat fosfataza HMG-CoA sintetaza	Hormoni steroizi Dietă săracă în colesterol

Viteza de degradare a enzimelor este controlată prin marcarea lor cu ubiquitină (în vederea recunoaşterii de către proteaze), şi prin modificarea concentraţiei sau a activităţii proteazelor (vezi metabolism proteic). Deoarece sinteza şi degradarea sunt procese relativ lente ajustarea vitezei lor este utilizată pentru a răspunde la modificările de durată a condiţiilor de mediu.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CONTROLUL ACTIVITĂŢII ENZIMELOR REGLATOARE

Activitatea sau eficienţa catalitică a enzimelor poate fi reglată prin:

- modificarea concentraţiei substratului sau a cofactorilor enzimatici;
- acţiunea efectorilor allosterici;
- modificare covalentă reversibilă sau ireversibilă.

✓ Modificarea concentraţiei substratului

În general, căile de biosinteză şi cele de degradare sunt localizate în compartimente celulare diferite (citosol, mitocondrii, etc.). Acest fapt facilitează reglarea lor independentă, inclusiv prin modularea concentraţiei substratelor enzimelor reglatoare, concentraţie care depinde de eficienţa transportorilor membranari. De exemplu, sinteza acizilor graşi din acetil-CoA are loc în citosol, iar degradarea lor până la acetil-CoA are loc în mitocondrie. Ca urmare, viteza de degradare a acizilor graşi va depinde de nivelul lor mitocondrial, respectiv de funcţionarea sistemului specific de transport (vezi metabolism).

✓ Acţiunea efectorilor allosterici

Enzimele reglatoare sunt sensibile la acţiunea efectorilor pozitivi (activatori) şi negativi (inhibitori). Activatorul poate fi chiar substratul enzimei sau un intermediar al aceleiaşi căi metabolice, caz în care va determina "activarea în avans" ("feed-forward activation"). Inhibitorul este de obicei produsul enzimei sau produsul căii reglate de enzimă, caz în care va determina inhibiţia prin produs final ("feed-back inhibition"). Ca exemplu se poate da hexokinaza şi piruvat kinaza, enzime reglatoare ale glicolizei. Hexokinaza este activată de

substratul ei glucoza, şi este inhibată de produsul reacţiei catalizate glucozo-6-fosfat, atunci când concentraţia lor depăşeşte un anumit nivel. Piruvat kinaza este activată în avans de către intermediarul fructozo-1,6-difosfat, şi este inhibată de către ATP, unul dintre produşii finali ai căii (fig. 1.62).

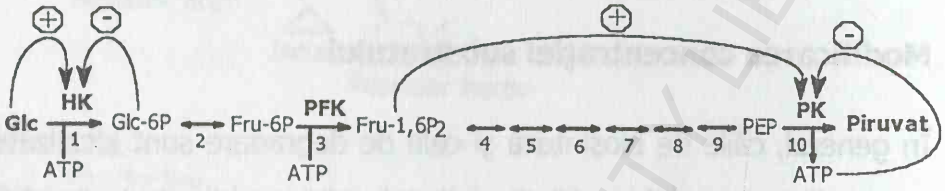


FIGURA 1.62.
Reglarea allosterică a hexokinazei şi a piruvat kinazei.

✓ **Modificare covalentă**

Modificarea covalentă a unei enzime este sinonimă cu modificarea structurii primare. Această modificare poate fi:

- *ireversibilă*; dacă constă în proteoliza parţială;
- *reversibilă*, dacă constă în ataşarea unor grupări.

Modificare covalentă ireversibilă

Proteoliza parţială, prin acţiunea specifică a proteazelor, reprezintă un mecanism de activare a unor enzime implicate în digestie, coagulare, fibrinoliză, precum şi în dezvoltarea programată (tabel 7).

Aceste enzime, secretate într-o formă inactivă (zimogeni), sunt activate ca urmare a modificărilor conformaţionale induse prin îndepărtarea unor aminoacizi. Procesul de activare este ireversibil. Protezele digestive rămân active până în momentul autodegradării. Celelalte tipuri de proteaze sunt antrenate în curentul circulator şi sunt fie degradate de

BCU "ASACHI" TRANSILVANIA UNIVERSITY LIBRARY

ficat, fie inhibate de alte proteine care se leagă strâns de centrul lor catalitic.

TABEL 7. Enzime reglate prin proteoliză parţială

Enzime digestive Tripsina, chimotripsina, carboxipeptidaza A şi B, elastaza, pepsina, fosfolipaza
Enzime implicate în coagularea sângelui Factorii VII, IX, X XI, XIII, kalikreina, trombina
Enzime implicate în dizolvarea cheagului Plasminogen, activatorul plasminogenului
Enzime implicate în apărarea imună Complement
Enzime implicate în dezvoltarea programată Colagenaza

Proteazele digestive se activează succesiv, în cascadă, ca o consecinţă a acţiunii enterokinazei, enzimă secretată de mucoasa intestinală (fig. 1.63).

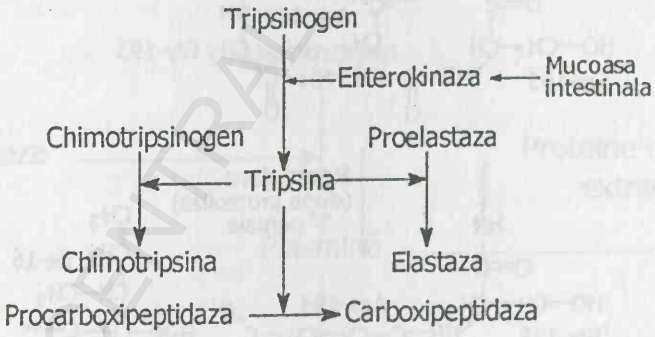


FIGURA 1.63.
Activarea proteazelor digestive

Activarea în grup a acestor enzime este în concordanţă cu rolul lor biologic; digestia proteinelor din bolul alimentar.

Pentru chimotripsină activarea este sinonimă cu hidroliza legăturii peptidice dintre Arg_{15} şi Ile_{16} (fig. 1.64). Prin scindarea acestei legături se

produce o modificare conformaţională care conduce la constituirea centrului catalitic al enzimei (fig. 1.65).

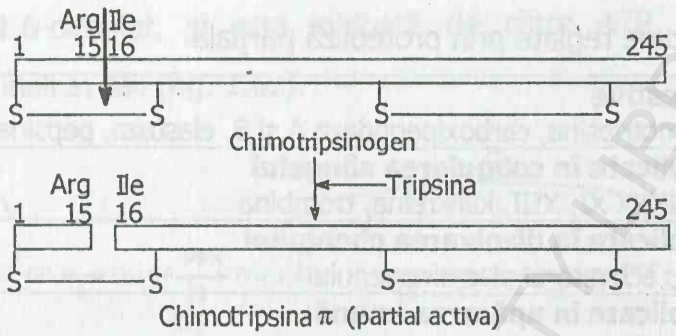


FIGURA 1.64.
Tansformarea chimotripsinogenului în chimotripsină

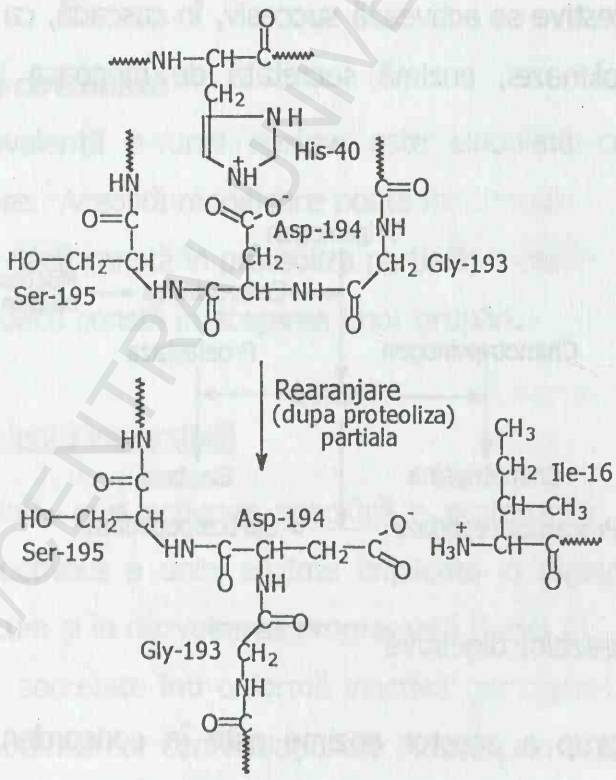


FIGURA 1.65.
Modicarea conformaţională indusă prin clivarea legăturii peptidice dintre Arg_{15} şi Ile_{16} din chimotripsinogen.

BUJASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În chimotripsinogen carboxilul Asp_{194} este implicat într-o legătură de hidrogen cu His_{40}. Ca urmare, gruparea NH a Gly_{193} nu este în poziţia adecvată pentru a lega, prin legătură de hidrogen, oxigenul carbonilic al substratului (vezi mecanismul de acţiune). Clivarea legăturii dintre Arg_{15} şi Ile_{16} facilitează formarea unei legături ionice între gruparea α-NH_2 a Ile_{16} şi Asp_{194} şi consecutiv, orientarea corectă a Gly_{193}.

Pentru a proteja celulele care îi sintetizează, zimogenii enzimelor digestive se transformă în enzime active, la locul (intestin subţire) şi la timpul potrivit (în timpul digestiei). În anumite situaţii patologice poate avea loc activarea lor prematură, chiar în pancreas. Acest fapt conduce la instalarea pancreatitei acute, boală care poate să apară în alcoolism şi în afecţiunile vezicii biliare care conduc la obstrucţia secreţiei pancreatice.

Activarea zimogenilor stă la baza procesului de metastazare (fig. 1.66).

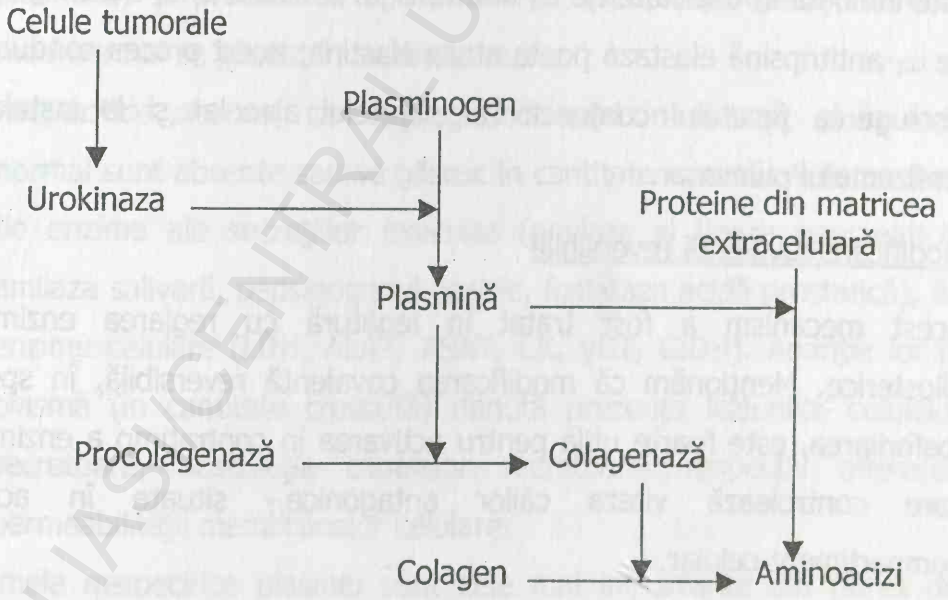


FIGURA 1.66.
Mecanismul împrăştierii celulelor tumorale (metastază)

CU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Transformarea plasminogenului şi a procolagenazei în plasmină, respectiv colagenază, conduce la degradarea proteinelor din matricea extracelulară şi a colagenului din membrana bazală a capilarelor şi a sistemului limfatic. Ca urmare, este facilitată deplasarea celulelor tumorale, migrarea prin sânge sau sistem limfatic, către noi ţesuturi sau organe.

Pentru serin proteaze există inhibitori proteici specifici numiţi *serpine*. Acestea se comportă ca nişte substrate care se leagă foarte strâns de centrul activ al enzimelor respective dar nu pot fi hidrolizate deoarece complexul enzimă-serpină este foarte rigid. O astfel de serpină este α_1-antitripsina. Ea are rolul de a inhiba elastaza, o protează eliberată în spaţiul extracelular de către neutrofile. Elastaza acţionează asupra elastinei din pereţii alveolelor pulmonare precum şi asupra altor proteine structurale. În plămânul normal, nivelul elastazei este scăzut, şi enzima este inhibată în totalitate de α_1-antitripsină. În cazul unui deficit genetic de α_1-antitripsină elastaza poate ataca elastina; acest proces conduce la distrugerea ţesutului conjunctiv al peretelui alveolar şi la instalarea emfizemului pulmonar.

Modificare covalentă reversibilă

Acest mecanism a fost tratat în legătură cu reglarea enzimelor allosterice. Menţionăm că modificarea covalentă reversibilă, în special fosforilarea, este foarte utilă pentru activarea în contratimp a enzimelor care controlează viteza căilor antagonice,- situate în acelaşi compartiment celular.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

APLICAŢII CLINICE ALE ENZIMELOR

Principiile enzimologiei, prezentate anterior, sunt aplicate curent în laboratoarele clinice pentru măsurarea activităţii enzimelor sau/şi dozarea substratelor lor din lichidele biologice şi ţesuturi.

Utilizarea enzimelor pentru diagnostic

Determinarea activităţii unor enzime, sau a concentraţiei substratelor lor, poate fi utilă pentru diagnosticarea unor boli manifeste clinic, depistarea a unor boli genetice, precum şi pentru urmărirea eficienţei terapeutice. Cel mai frecvent se determină activitatea enzimelor plasmatice. În plasmă există două tipuri de enzime:

- *specifice plasmei*, cu rol în coagulare (ex. trombină), fibrinoliză (ex. plasmină) şi procesarea lipoproteinelor (lipoproteinlipază), care în mod normal se găsesc în cantitate mare;
- *nespecifice plasmei*, care ajung accidental în plasmă, şi în mod normal sunt absente sau se găsesc în cantitate minimă. Acestea sunt fie enzime ale secreţiilor exocrine (amilaza şi lipaza pancreatică, amilaza salivară, pepsinogenul gastric, fosfataza acidă prostatică), fie enzime celulare (LDH, ALAT, ASAT, CK, γGT, GlDH). Apariţia lor în plasmă (în cantitate crescută) denotă prezenţa leziunilor celulelor secretoare, obstrucţia canalelor secretoare, respectiv alterarea permeabilităţii membranelor celulare.

Enzimele nespecifice plasmei sunt cele mai importante din punct de vedere clinic deoarece ajung în plasmă ca urmare a alterării ţesuturilor şi organelor. Natura enzimei, a cărei activitate creşte în ser, precum şi intensitatea creşterii, sunt dependente de:

BCU "IOAN SLAVICI" TIMIŞOARA UNIVERSITY LIBRARY

- extinderea leziunii,
- localizarea tisulară şi celulară a enzimei,
- viteza de degradare şi eliminare a enzimei.

Enzimele cu greutate moleculară mică vor apărea primele în plasmă (cele citosolice înaintea celor mitocondriale) cu o viteză direct proporţională cu gradientul de concentraţie transmembranar şi gradul de întindere a necrozei tisulare.

Enzimele sunt îndepărtate din plasmă cu viteză diferită, dependentă de mărime, stabilitate şi de grad de captare de către sistemul reticuloendotelial. Enzimele cu greutate moleculară mică (ex. α-amilaza) sunt îndepărtate pe cale urinară. Fosfataza alcalină hepatică se elimină prin bilă. Restul enzimelor sunt captate şi degradate de către macrofage.

Viteza de dispariţie din plasmă, reflectată de timpul de înjumătăţire (T/2), variază de la o enzimă la alta sau chiar de la o izoenzimă la alta. De exemplu izoenzimele LDH_1 şi LDH_2 (de tip miocardic) şi izoenzima LDH_5 (de tip hepatic şi muscular) au T/2 = 60-180 ore, respectiv T/2 = 8-12 ore. Ca urmare, nivelul LDH_1 şi LDH_2 este deosebit de util pentru confirmarea diagnosticului de infarct miocardic, spre deosebire de nivelul LDH_5 care are valoare diagnostică doar în caz de leziuni acute şi extinse ale ficatului şi musculaturii.

Pentru diagnosticul specific cele mai utile sunt aşa numitele enzime marker, specifice unui anumit organ. De exemplu alcool dehidrogenaza (cu localizare hepatică) este utilă pentru diagnosticarea afecţiunilor hepatice, iar fosfataza acidă (localizată la nivelul prostatei) este utilă pentru diagnosticarea carcinomului de prostată. Deoarece enzimele marker sunt în număr redus, pentru diagnosticarea specifică a altor

BCU "SPIRU HARET" UNIVERSITY LIBRARY

afecţiuni (cardiace, hepatice, musculare, osoase, pancreatice) se recurge la determinarea unei baterii de enzime (vezi tabel 8).

TABEL 8.
Exemple de boli şi principalele enzime utilizate pentru diagnosticarea lor

Denumirea bolii	**Enzimele dozate în scop diagnostic**
Infarct miocardic	Creatin kinaza (CK), Aspartat transaminaza (AST) Lactat dehidrogenaza (LDH)
Hepatită acută sau cronică	Aspartat transaminaza (AST) Alanin transaminaza (ALT)
Insuficienţă hepatică (ciroză)	Colinesteraza nespecifică (CHE)
Intoxicaţii cu organofosforice	Colinesteraza nespecifică (CHE)
Alcoolism	γ-Glutamil transpeptidaza (GGT)
Colestază intrahepatică şi extrahepatică	Fosfataza alcalină (ALP) γ-Glutamil transpeptidaza (GGT)
Rahitism	Fosfataza alcalină (ALP)
Pancreatită acută	Amilaza (AMS)
Carcinom de prostată	Fosfataza acidă (ACP)

Pentru diagnosticul prenatal al bolilor genetice (ex. boli lizozomale, glicogenoze etc.) este utilă dozarea unor enzime din celulele lichidului amniotic (recoltat prin puncţie amniotică după a 16-a săptămână de sarcină), sau din leucocite. Uneori este utilă dozarea unor enzime eritrocitare. Astfel, pentru diagnosticarea sindromului anemiei hemolitice, a methemoglobinemiei congenitale sau a hipovitaminozei B_1 se determină glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, NADH-diaforaza, respectiv transcetolaza.

Utilizarea enzimelor ca reactivi

Dacă concentraţia enzimei (şi a cofactorilor enzimatici) este suficient de mare ([E]>>[S]) viteza reacţiei enzimatice este proporţională cu concentraţia substratului. Pe acest principiu se bazează dozarea unor compuşi din lichidele biologice (ex. glucoză, uree, acid uric, etc.) prin aşa numitele metode enzimatice, mai specifice decât cele chimice, care stau la baza kiturilor folosite de analizoarele automate. De obicei enzima este imobilizată pe un suport solid alături de cofactorii enzimatici şi reactivul de culoare. În contact cu lichidul biologic, care conţine substratul enzimei, se formează un compus colorat. Intensitatea culorii, măsurată spectrofotometric, permite determinarea concentraţiei substratului specific enzimei.

Chimia analitică modernă utilizează şi metodele imunoenzimatice, rezultat al mariajului enzimologiei cu imunologia. Cuplarea anticorpilor specifici unui antigen proteic cu o enzimă indicator (ex. fosfatază) stă la baza unor metode de dozare foarte sensibile şi specifice. Complexul antigen-anticorp specific este pus în contact cu substratul enzimei (ex. p-nitro-fenilfosfat) fixate pe anticorp. Ca urmare se generează un produs colorat (ex. p-nitrofenol) a cărui concentraţie este proporţională cu aceea a complexului antigen-anticorp. Aceste metode imunoenzimatice sunt denumite metode ELISA (abrevierea denumirii englezeşti "Enzyme-Linked ImmunoadSorbent Assay"). Asemenea metode sunt utilizate frecvent la evidenţierea virusului imunodeficienţei umane (HIV), a drogurilor etc.

Enzimele imobilizate pe matrici solide, ca de exemplu *β-galactozidaza şi 11-β-hidroxilaza*, sunt utilizate în industria farmaceutică pentru producerea pe scară largă a unor medicamente (lapte cu conţinut redus

de lactoză, respectiv prednison) utilizate pentru tratarea unor boli (intoleranţă scăzute la lactoză, respectiv inflamaţii).

Utilizarea enzimelor ca medicamente

Unele enzime sunt utilizate ca medicamente, în terapia unor boli. De exemplu, *streptokinaza* (un amestec de enzime extras dintr-un streptococ) este utilă pentru dizolvarea cheagurilor care apar în infarctul miocardic. Ea activează plasminogenul, o proenzimă fibrinolitică prezentă în mod normal în plasmă. Ca urmare rezultă plasmina, o serin protează, care clivează fibrina insolubilă din cheagul de sânge. O altă serin protează, utilizată în acelaşi scop, este *activatorul tisular al plasminogenului* (t-PA). Această enzimă este produsă la scară industrială prin bioinginerie genetică, folosind ca vector o plasmidă din E. coli.

Asparaginaza este utilizată pentru tratarea unor tipuri de leucemie. Celulele tumorale sunt dependente de asparagină, un aminoacid pe care îl preiau din plasmă. Administrarea intravenoasă a asparaginazei determină scăderea nivelului asparaginei plasmatice şi astfel scade viabilitatea celulelor tumorale.

Majoritatea enzimelor au un timp de înjumătăţire scurt. Pentru a creşte stabilitatea lor în plasmă acestea sunt imobilizate pe matrici solide care apoi sunt implantate în materiale perfuzabile.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Partea II-a

COFACTORI ENZIMATICI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COFACTORI ENZIMATICI
Definiţie & Clasificare
COFACTORI ANORGANICI
Caracteristici
Rol biologic
Patologie asociată

COFACTORI ENZIMATICI

Definiţie & Clasificare

Din punct de vedere al rolului biologic, cofactorii sunt compuşi indispensabili enzimelor pentru îndeplinirea funcţiei catalitice.

Din punct de vedere structural, cofactorii pot fi *compuşi anorganici* (majoritatea cationi metalici) sau *compuşi organici micromoleculari* (majoritatea heterociclici) care posedă anumite proprietăţi structurale şi o reactivitate chimică deosebită.

COFACTORI ANORGANICI

Pentru a-şi putea îndeplinii rolul catalitic unele enzime, numite *metaloenzime*, se asociază prin legături ionice sau coordinative, cu un cofactor anorganic, metalic sau nemetalic (tabel 2.1).

Caracteristici

- majoritatea cofactorilor sunt cationi (posedă sarcină pozitivă), cu excepţia anionului Cl^-;
- majoritatea cofactorilor cationici fac parte din grupa metalelor tranziţionale (Fe, Mn, Mo, Co, Cu, Zn), dar pot fi şi ioni ai metalelor alcaline (K^+, Na^+) sau alcalino-pământoase (Ca^{2+}, Mg^{2+});

BCU "ASTRA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL 2.1. Cofactori anorganici & Metaloenzime

Cofactori		Metaloenzimă
Metalici	Cu^{+} Cu^{2+}	Citocrom-C oxidaza, feroxidaza, lizil hidroxilaza, dopamin hidroxilaza, superoxid dismutaza, Δ^{9}-desaturaza
	Zn^{2+}	Lactat dehidrogenaza, fosfataza alcalină, anhidraza carbonică, carboxipeptidaza, RNA şi DNA polimeraza, etc.
	Fe^{2+} Fe^{3+}	NADH-CoQ reductaza, mieloperoxidaza, α-glicerofosfat oxidaza mitocondrială, monoamino oxidaza
	Mn^{2+}	Hidrolaze, decarboxilaze, transferaze
	Mo^{2+}	Xantin oxidaza
	Se^{2+}	Glutatation peroxidaza
	Mg^{2+}	Kinaze
	Ca^{2+}	Enzime Ca-calmodulin dependente
	K^{+}	Piruvat kinaza
Nemetalici	Cl^{-}	Amilaza

Rolul dominant al metalelor tranziţionale (cu orbitali d vacanţi) se datorează faptului că:

- pot exista în mai multe stări de oxidare, deci pot ceda & accepta electroni;
- se comportă ca acizi de tip Lewis, deci pot fi coordinaţi de un număr variabil (2, 4, 5, 6 sau 8) de liganzi negativi (ex. $-COO)^{-}$ sau care conţin atomi ce posedă cel puţin o pereche de electroni neparticipanţi (ex. atomul de N din radicalul imidazolic al His).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rolul cofactorilor anorganici

Cofactorii anorganici pot ajuta enzimele în mai multe moduri:

a). Induc modificări conformaţionale care conduc la creşterea afinităţii pentru substrat. De exemplu, K^+ măreşte afinitatea piruvat kinazei pentru fosfoenolpiruvat şi contribuie la poziţionarea adecvată a acestui substrat faţă de centrul de legare a cosubstratului, ADP (fig. 2.1).

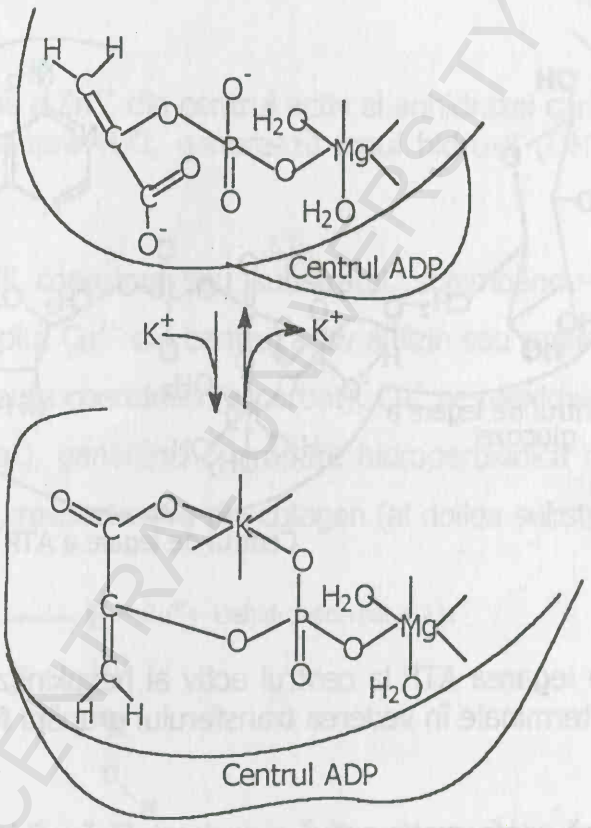


FIGURA 2.1.
Contribuţia K^+ în legarea şi poziţionarea corectă a fosfoenolpiruvatului la centrul activ al piruvat kinazei

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Induc modificări conformaţionale care conduc la activarea enzimei. De exemplu, Ca^{2+} activează enzimele Ca-calmodulin dependente de tipul fosforilaz kinazei.

c). Leagă substratul sau cosubstratul la centrul activ al enzimei. De exemplu, Mg^{2+} prin coordinarea ATP formează adevăratul substrat al kinazelor şi, în plus, contribuie la labilizarea legăturii P-O în vederea transferului grupării fosfat terminale (fig. 2.2).

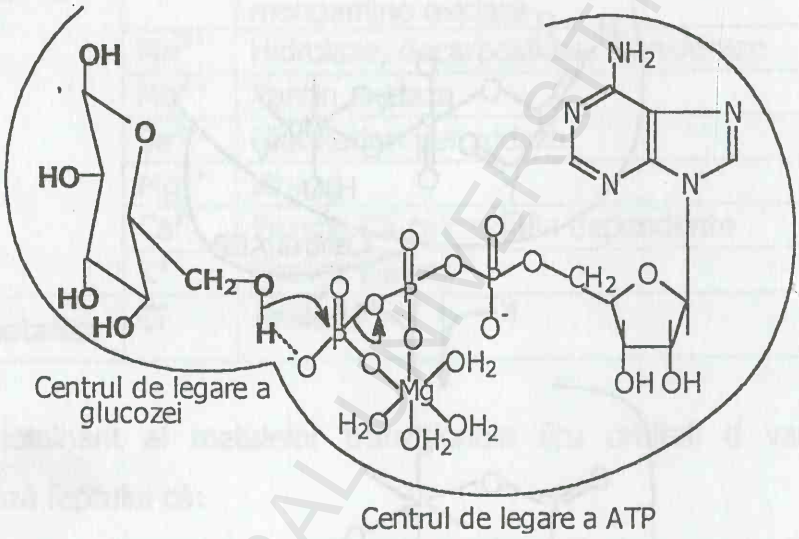


FIGURA 2.2.
Rolul Mg^{2+} în legarea ATP la centrul activ al hexokinazei şi în labilizarea legăturii P-O terminale în vederea transferului grupării fosfat pe glucoză

d). Stabilizează conformaţia activă a enzimei, fără a fi implicat în cataliză. De exemplu, Mn^{2+} stabilizează conformaţia centrului activ al piruvat carboxilazei.

e). Atacă electrofil substratul, fără a-şi modifica gradul de oxidare. De exemplu, ionul de Zn^{2+}, din centrul activ al anhidrazei arbonice, atacă

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

molecula de apă şi astfel generează ionul hidroxil, fără a-şi modifica gradul de oxidare (fig. 2.3).

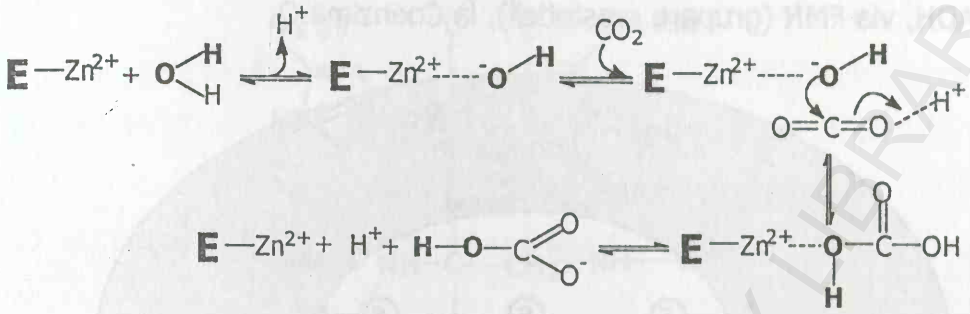


FIGURA 2.3.
Rolul de acid Lewis a Zn^{2+} din centrul activ al anhidrazei carbonice; atacul electrofil asupra H_2O, generează ionul hidroxil (OH^-) care atacă nucleofil CO_2.

f). Atacă electrofil coenzima sau substratul, schimbându-şi gradul de oxidare. De exemplu, Cu^{2+} din centrul activ al lizin sau prolin hidroxilazei, se reduce în prezenţa coenzimei (ascorbat). Cu^+ se reoxidează pe seama O_2 (primul substrat), generând o grupare hidroperoxidică reactivă, care atacă radicalii Lys, respectiv Pro din colagen (al doilea substrat) (fig.2.4).

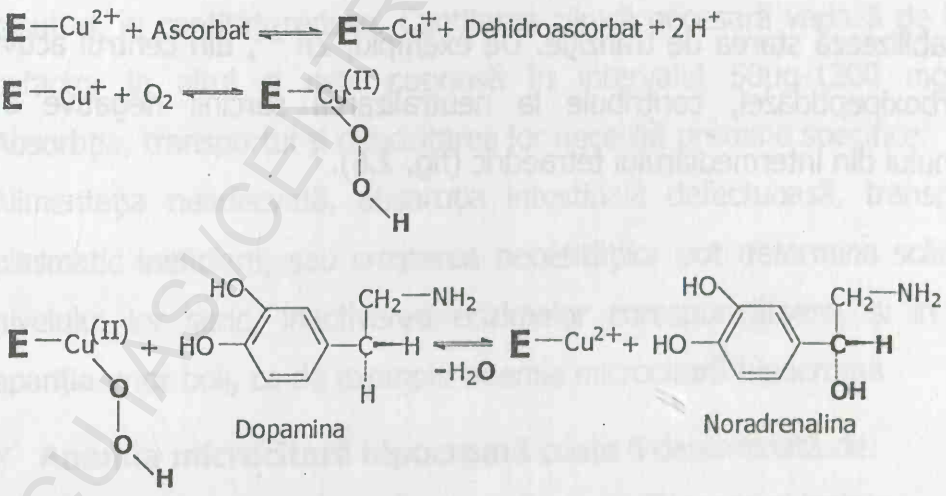


FIGURA 2.4.
Rolul Cu în activarea O_2 utilizat de dopamin hidroxilază

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un alt exemplu, Fe din "centrii cu Fe şi S" (fig. 2.5) localizaţi în centrul activ al NADH dehidrogenazei sunt implicaţi în transferul de electroni de la NADH, via FMN (grupare prostetică), la Coenzima Q.

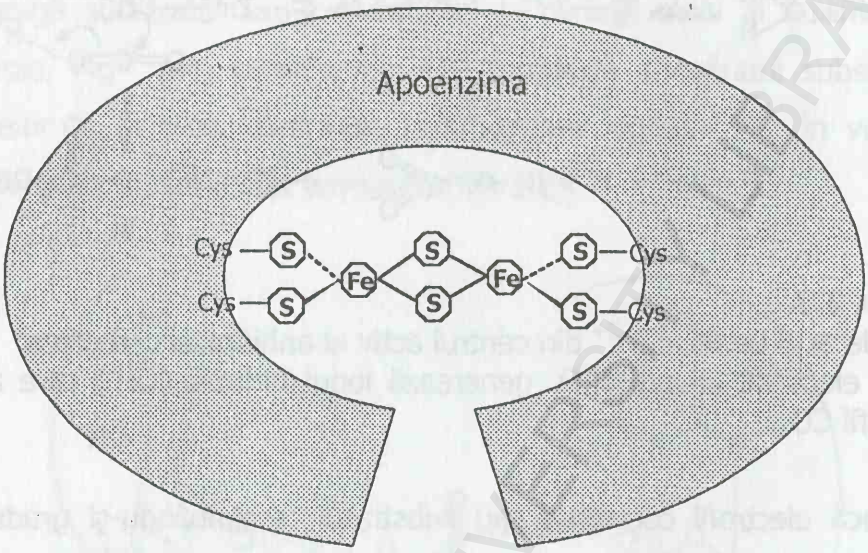


FIGURA 2.5.
Centrii [2Fe-2S] din centrul activ al NADH dehidrogenazei.
În starea oxidată ambii atomi de Fe sunt în starea Fe^{3+}, după reducere numai unul dintre atomi trece în starea Fe^{2+}.

g). Stabilizează starea de tranziţie. De exemplu, Zn^{2+}, din centrul activ al carboxipeptidazei, contribuie la neutralizarea sarcinii negative a oxigenului din intermediarului tetraedric (fig. 2.6).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

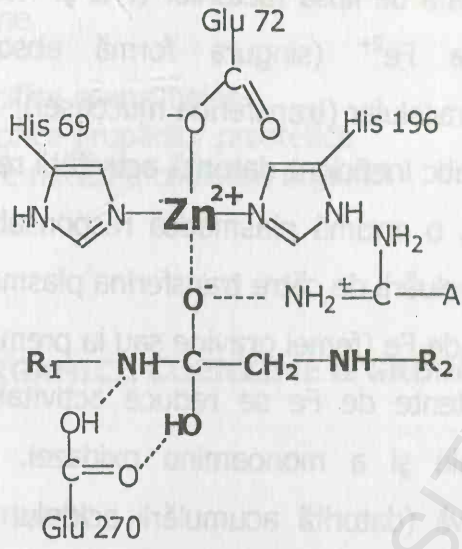


FIGURA 2.6.
Rolul Zn^{2+}, din centrul activ al carboxipeptidazei, în stabilizarea stării de tranziţie (vezi mecanismul de acţiune al proteazelor)

Patologia asociată deficitului de cofactori anorganici

Cofactorii metalici sunt preluaţi din alimente, şi se depozitează în ţesuturi, în cantităţi reduse. Cantitatea zilnică necesară variază de la un cofactor la altul şi este cuprinsă în intervalul 50µg-1200 mg /zi. Absorbţia, transportul şi depozitarea lor necesită proteine specifice.
Alimentaţia neadecvată, absorbţia intestinală defectuoasă, transportul plasmatic ineficient, sau creşterea necesităţilor pot determina scăderea nivelului lor seric, inactivarea enzimelor corespunzătoare, şi în final apariţia unor boli, ca de exemplu anemia microcitară hipocromă.

✓ **Anemia microcitară hipocromă** poate fi determinată de:

- regimul alimentar sărac, bazat exclusiv pe făinoase şi lactate;

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

- malabsorbţia cauzată de lipsa factorilor (HCl şi vitamina C) necesari reducerii Fe^{3+} la Fe^{2+} (singura formă absorbabilă), sau a transportorului intracelular (transferina mucoasei);
- transportul plasmatic ineficient datorită activităţii reduse (din lipsă de Cu) a feroxidazei, o enzimă plasmatică responsabilă de reoxidarea Fe^{2+} în vederea preluării de către transferina plasmatică;
- necesarul crescut de Fe (femei gravide sau la premenopauză).

În cazul carenţei latente de Fe se reduce activitatea α-glicerofosfat oxidazei mitocondriale şi a monoamino oxidazei. Astfel se explică fatigabilitatea excesivă (datorită acumulării acidului lactic în muşchi), iritabilitatea crescută (datorită reducerii catabolizării catecolaminelor), şi perturbarea termogenezei (datorită secreţiei deficitare de hormoni tiroidieni). În cazul carenţei prelungite de Fe se instalează anemia microcitară hipocromă (datorită scăderii sintezei de Hb), se dezvoltă leziuni atrofice ale mucoasei digestive şi consecutiv scade secreţia de HCl.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Caracteristici comune
Clasificare
Caracteristicile specifice coenzimelor
Caracteristicile specifice grupărilor prostetice
Tipuri de reacţii care necesită cofactori organici

COFACTORI ORGANICI. COENZIME & GRUPĂRI PROSTETICE

Caracteristici comune:

- Sunt micromolecule organice, termostabile;
- Conţin heterocicluri (excepţie cofactorul β-hidroxibutirat dehidrogenazei = fosfolipidă);
- Majoritatea sunt derivaţi ai vitaminelor hidrosolubile;
- Nu sunt responsabili de specificitatea enzimei, acelaşi cofactor poate coopera cu diferite enzime;
- Sunt necesare oxido-reductazelor, transferazelor, izomerazelor şi ligazelor.

Clasificare

După natura legăturilor stabilite cu apoenzima, cofactorii organici pot fi coenzime sau grupări prostetice.

Caracteristicile specifice coenzimelor:

- Se ataşează prin legături slabe, necovalente de apoenzimă, deci pot fi îndepărtate prin dializă;
- Reacţionează stoechiometric, deci pot fi considerate cosubstrate;
- Mecanismul reacţiei catalizate de holoenzimă este de tip secvenţial ordonat (fig. 2.7) sau întâmplător (fig. 2.8);

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Suferă modificări care contrabalansează modificările suferite de substrat.; pentru a reveni la forma iniţială trebuie să coopereze cu o altă apoenzimă (fig. 2.9).

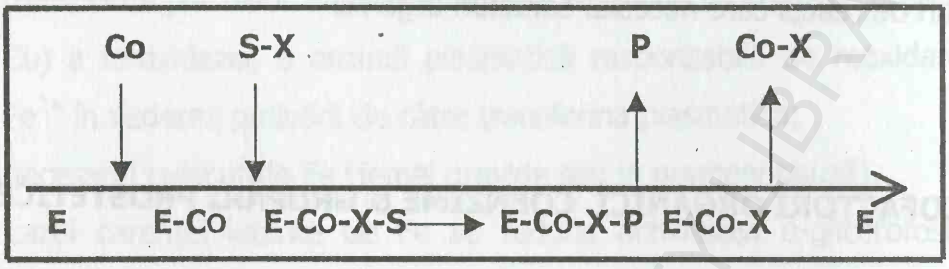


FIGURA 2.7.
Mecanismul secvenţial ordonat
(Co=coenzimă; S=substrat; X=grupare transferabilă; P=produs).

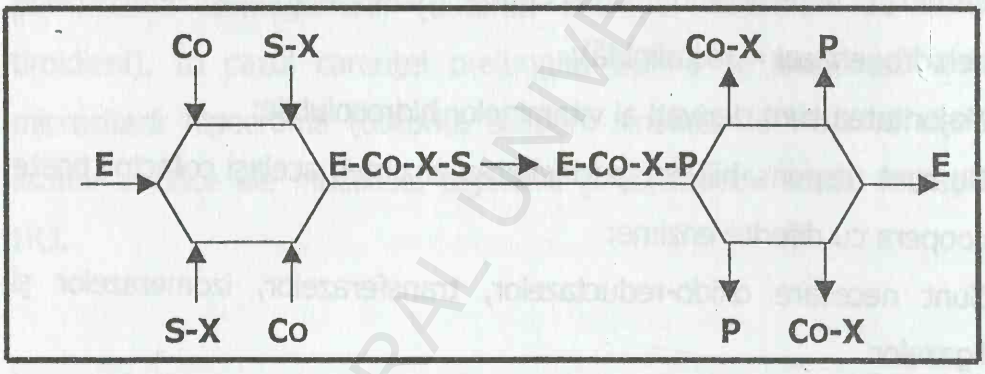


FIGURA 2.8.
Mecanismul secvenţial întâmplător
(Co=coenzimă; S=substrat; X=grupare transferabilă din substrat)

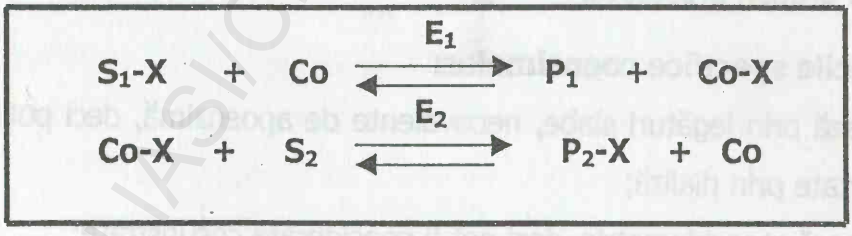


FIGURA 2.9.
Schema funcţionării coenzimelor
(Co=coenzimă; S_1-X şi P_1=substrat donor, respectiv produs al enzimei E_1; S_2 şi P_2-X=substrat acceptor, respectiv produs al enzimei E_2).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Caracteristicile specifice grupărilor prostetice

- Se ataşează prin legături covalente de apoenzimă, deci nu pot fi îndepărtate prin dializă;
- Mecanismul reacţiei catalizate de holoenzimă este de tip ping-pong (fig.2.10);
- Suferă modificări care contrabalansează modificările suferite de un substrat şi revine la forma iniţială ca urmare a reacţiei cu cel de-al doilea substrat (fig. 2.11).

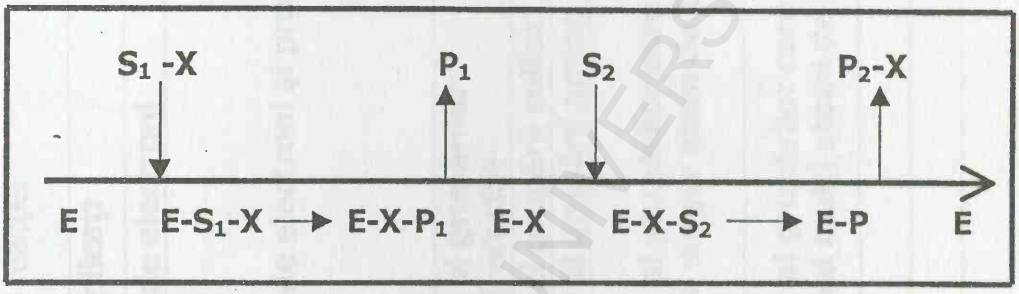


FIGURA 2.10.
Mecanismul ping-pong
(E=holoenzima= enzima+gruparea prostetică; S_1-X şi S_2 = substrate; P_1 şi P_2-X= produşi),

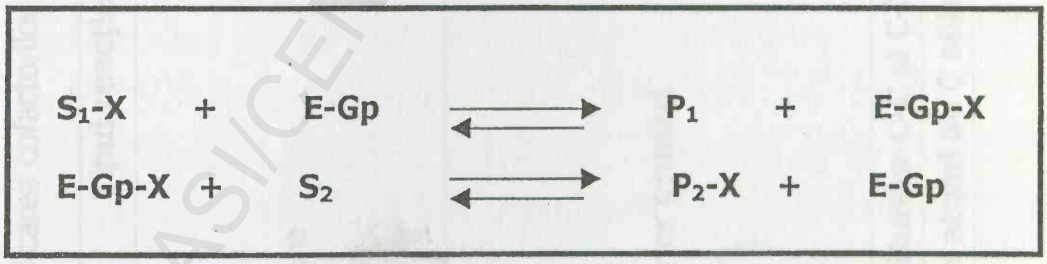


FIGURA 2.11. Schema funcţionării enzimelor care conţin grupări prostetice
(E-Gp = holoenzimă = apoenzimă+grupare prostetică; E-Gp-X = stare intermediară a holoenzimei; S_1-X = substratul donor; S_2 = substratul acceptor; P_1 şi P_2-X = produşi).

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Clasificarea cofactorilor în funcţie de tipul reacţiei la care participă

Cofactorii organici, coenzime sau grupări prostetice, pot participa la reacţii de:

- oxido-reducere (transfer de electroni);
- transfer al unor grupări;
- clivare a legăturilor C-C şi C-X;
- rearanjare a substituenţilor atomilor de carbon adiacenţi (tabel 2.2).

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL 2.2. Clasificarea cofactorilor organici după tipul reacţiei

Tipul reacţiei în care sunt implicaţi		Cofactori
Oxido-reducere	**Transfer de electroni**	Hem
	Transfer de electroni şi protoni	Nicotinici: NAD^+ şi $NADP^+$ Flavinici: FMN şi FAD Tetrahidrobiopterina Acidul lipoic Acidul ascorbic Vitamina K Coenzima Q
Transfer al unor grupări	**Transfer al grupărilor: fosfat, pirofosfat**	Nucleotide trifosforilate: ATP, UTP, CTP
	Transfer al grupării sulfat	Fosfoadenozin fosfosulfat
	Transfer al grupării amino	Piridoxal fosfat
	Transfer al grupărilor care conţin un singur atom de C	S-Adenozil metionina Acidul tetrahidrofolic Metil cobalamina Biotina
	Transfer al grupărilor care conţin mai mulţi atomi de C	Fosfopanteteina Coenzima A Acidul dihidrolipoic
Clivare a legăturilor C-C şi C-X		Tiamin pirofosfatul
Rearanjare la atomi de C adiacenţi		Deoxiadenozil cobalamina

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN REACŢII DE OXIDO-REDUCERE

A. COFACTORI IMPLICAŢI ÎN TRANSFER DE ELECTRONI (e^-)

Hem

Enzime heminice

B. COFACTORI IMPLICAŢI ÎN TRANSFERUL DE ($e^- + H^+$):

NAD^+ şi $NADP^+$

Enzime nicotinice

FMN şi FAD

Enzime flavinice

Tetrahidrobiopterina (H_4B)

Enzime H_4B-dependente

Acidul lipoic

Enzime dependente de acidul lipoc

Acidul ascorbic

Enzime dependente de acidul ascorbic

Vitamina K

Enzime vitamin K-dependente

Coenzima Q (CoQ)

Enzime CoQ-dependente

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN REACŢII DE OXIDO-REDUCERE

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN TRANSFER DE ELECTRONI

HEM

Structura

Hemul este format dintr-un nucleu porfirinic coordinat cu un ion de Fe^{2+}. Nucleul porfirinic este format din 4 nuclee pirolice unite prin punţi metinice. Fiecare nucleu pirolic are 2 substituenţi care pot fi de tip metil ($-CH_3$), vinil ($-CH=CH_2$) sau propionil ($-CH_2-CH_2-COOH$). În total există 4 radicali metil (M), 2 radicali vinil (V) şi 2 radicali propionil (P) care, în cazul protoporfirinei IX (izomerul care formează hemul), sunt legaţi în ordinea: M,V,M,V,M,P,P,M (fig. 2.12).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

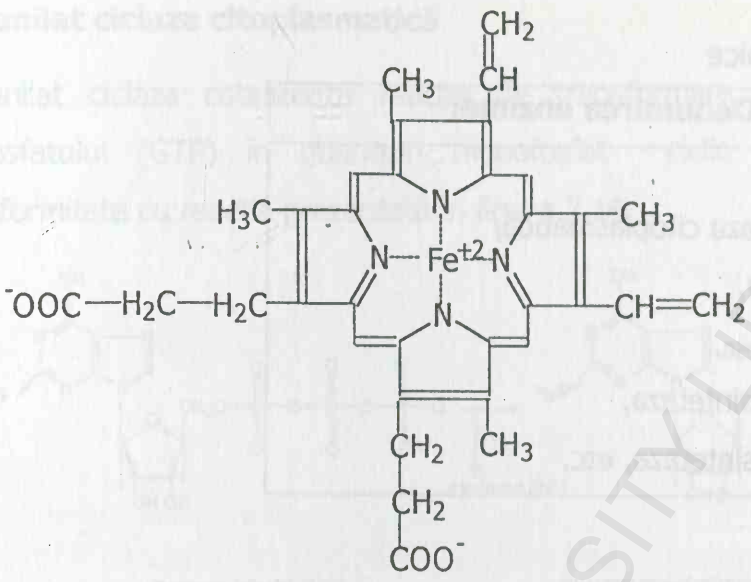


FIGURA 2.12.
Structura hemului

Sinteza

Hemul se sintetizează, mai ales în măduva osoasă şi ficat, din succinil-CoA, glicocol, şi Fe^{2+}, printr-o succesiune de 8 reacţii care vor fi prezentate la metabolismul hemului.

Rolul biologic

Datorită faptului că Fe heminic poate avea gradul de oxidare +2, sau +3, hemul poate îndeplini rolul de grupare prostetică pentru o serie de enzime care catalizează reacţii de transfer de electroni (vezi tabel 2.3).

Enzimele heminice îndeplinesc importante roluri biologice, care merită să fie comentate. Deocamdată, considerăm că este utilă prezentarea rolului biologic al catalazei, guanilat ciclazei citoplasmatice, NO sintetazei şi a citocromilor P450. Celelalte enzime heminice vor fi prezentate în cadrul metabolismului.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL 2.3.
Enzime heminice

Denumirea enzimei
Catalaza
Guanilat ciclaza citoplasmatică,
NO sintetaza,
Citocromii P_{450},
Tromboxan sintetaza,
Prostaciclin sintetaza, etc.

ENZIME HEMINICE

✓ Catalaza

Catalaza este o mono-oxigenază care utilizează H_2O_2 atât ca donor, cât şi ca acceptor de oxigen (fig 2.13).

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

FIGURA 2.13.
Reacţia catalizată de catalază

Catalaza se găseşte mai ales în peroxizomi, dar şi în citosol şi microzomi (în cantitate redusă).

Alături de glutation peroxidază, catalaza protejează organismul de acţiunea nocivă a apei oxigenate, compus care face parte din grupul "speciilor reactive ale oxigenului" (ROS).

BCU MEDICINA CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

✓ **Guanilat ciclaza citoplasmatică**

Guanilat ciclaza catalizează reacţia de transformare a guanozin trifosfatului (GTP) în guanozin monofosfat ciclic (cGMP), în conformitate cu reacţia prezentată în figura 2.14.

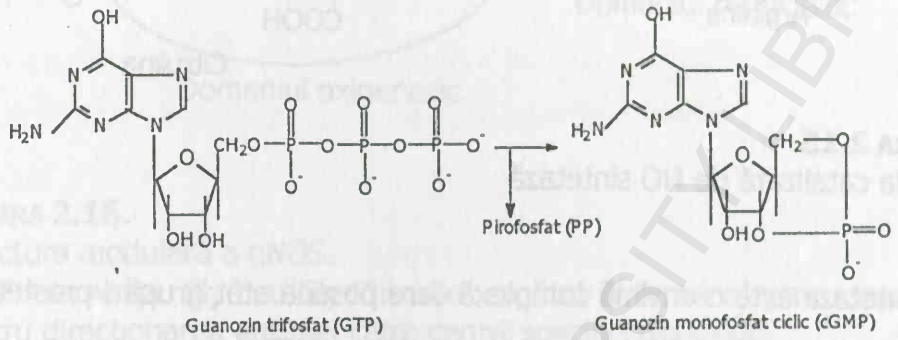


FIGURA 2.14.
Reacţia catalizată de guanilat ciclază

Izoforma citoplasmatică este localizată în celulele musculare netede din pereţii vasculari, trombocite, celulele bastonaş din retină. În aceste celule cGMP determină relaxare (vezi rolul NO), agregare, respectiv deschiderea canalelor de Na^+ (vezi rolul vitaminei A în mecanismul vederii).

✓ **NO sintetaza (NOS)**

Monoxid de azot sintetaza catalizează reacţia de transformare a argininei în NO, un compus foarte reactiv datorită faptului că posedă un electron neîmperecheat (fig. 2.15).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

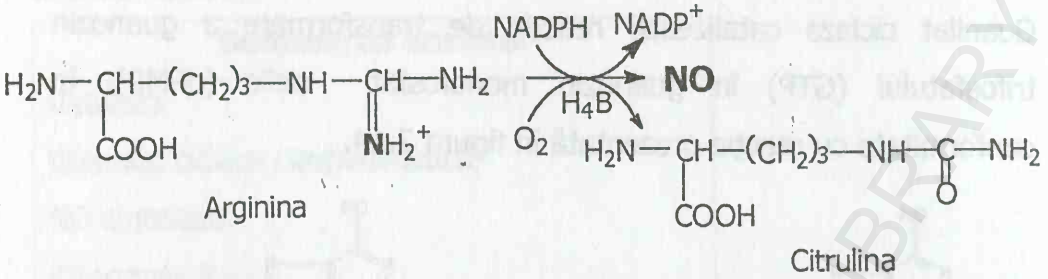


FIGURA 2.15.
Reacţia catalizată de NO sintetază

NO sintetaza este o enzimă complexă care posedă atât grupări prostetice (Hem, FMN, FAD), cât şi coenzime (NADPH, H_4B). În organismul uman există 2 familii de NOS:

- *constitutive*, Ca-calmodulin dependente, a căror concentraţie este constantă. Aceste izoforme au o structură modulară (fig. 2.16). Sunt distribuite în endoteliul vascular (eNOS), ţesutul nervos (nNOS), şi trombocite. NO format în aceste celule este implicat în relaxarea pereţilor vasculari (fig. 2.17), transmisia sinaptică lentă (fig. 2.18), respectiv prevenirea agregării plachetare;
- *inductibile*, a căror concentraţie creşte în prezenţa interleukinei-1 (IL-1), factorului de necroză tumorală (TNFα), interferonului (IFNγ), lipopolizaharidelor din membranele bacteriene (LPZ). Aceste izoforme, inductibile (iNOS), sunt distribuite în macrofage, neutrofile şi hepatocite. NO format în aceste celule are efect citotoxic asupra paraziţilor, bacteriilor şi celulelor canceroase (fig. 2.19).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

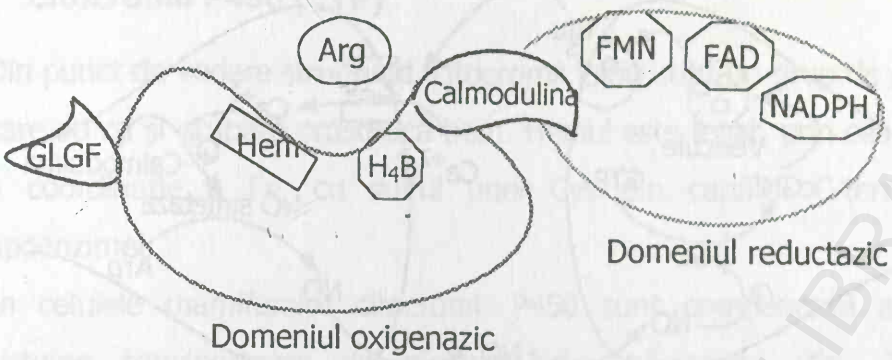


FIGURA 2.16.
Structura modulară a nNOS.
GLGF=secvenţa Gly-Leu-Gly-Phe din capătul N-terminal care serveşte pentru direcţionarea enzimei către centrii specifici din celulă.
Calmodulina este responsabilă de controlul fluxului de electroni de la NADPH (via FAD, FMN) către tetrahidrobiopterină (H_4B) şi Hem. După acceptarea unui elecron, Fe heminic se reduce la Fe^{2+} şi astfel devine posibilă legarea O_2 necesar sintezei NO.

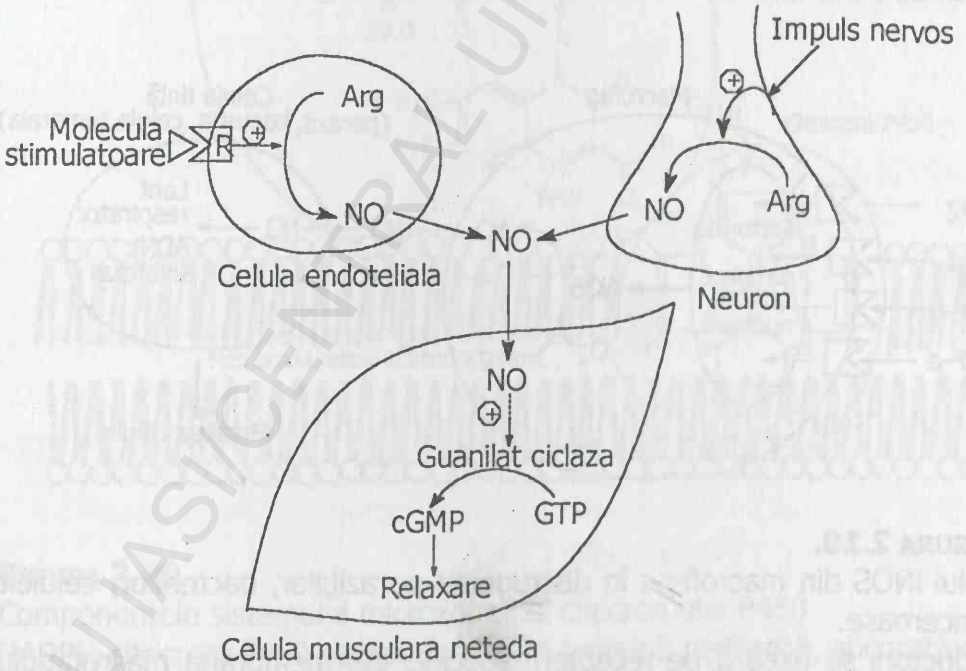


FIGURA 2.17.
Rolul NO sintetazei şi al guanilat ciclazei citoplasmarice în relaxarea peretelui vascular (NO="factor de relaxare derivat din endoteliu")

UMF IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

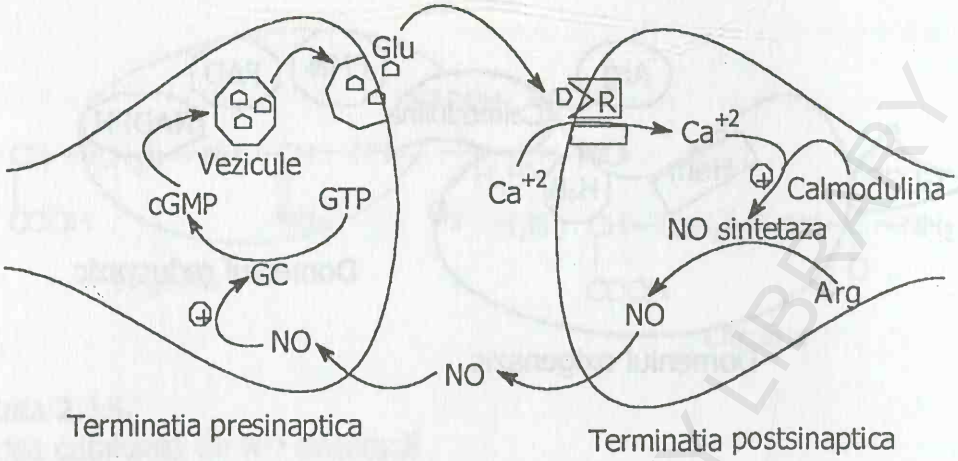


FIGURA 2.18.
Rolul nNOS şi al guanilat ciclazei în transmisia sinaptică lentă, proces care stă la baza procesului de învăţare&memorare
NO activează guanilat ciclaza (GC). cGMP determină eliberarea, prin endocitoză, a acidului glutamic (Glu) din vezicule. Legarea Glu de receptorul specific deschide canalul de Ca^{2+}. Fixarea Ca^{2+} pe calmodulină facilitează asocierea acesteia cu NOS. Enzima, activată astfel, sintetizează NO care pătrunde în neuronul presinaptic şi închide astfel ciclul de transformări.

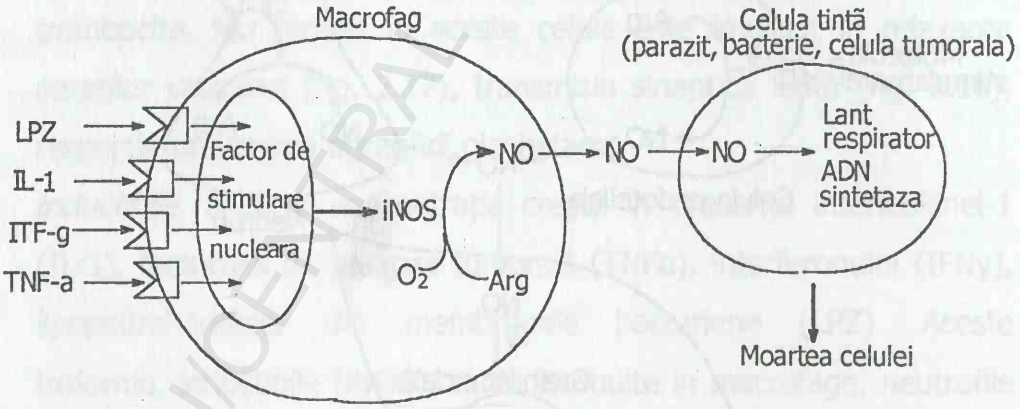


FIGURA 2.19.
Rolul iNOS din macrofage în distrugerea paraziţiilor, bacteriilor, celulelor canceroase.
Inductorii se fixează pe receptorii specifici din membrana macrofagului. Complexul inductor-receptor stimulează sinteza iNOS şi consecutiv a NO. NO pătrunde în celulele ţintă şi prin inhibiţia lanţului respirator, ADN sintetazei etc., determină moartea acestora.

FARMACIE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ Citocromii P450 (CYP)

Din punct de vedere structural, citocromii P450 sunt un grup de proteine care au ca şi grupare prostetică hem. Hemul este legat, prin cea de-a 5-a coordinaţie a Fe, cu sulful unei Cys din capătul C-terminal al apoenzimei.

În celulele mamiferelor citocromii P450 sunt componente ale unor sisteme transportoare de electroni din microzomi (fig. 2.20) şi mitocondrii (fig 2.21) unde servesc ca acceptori finali de electroni.

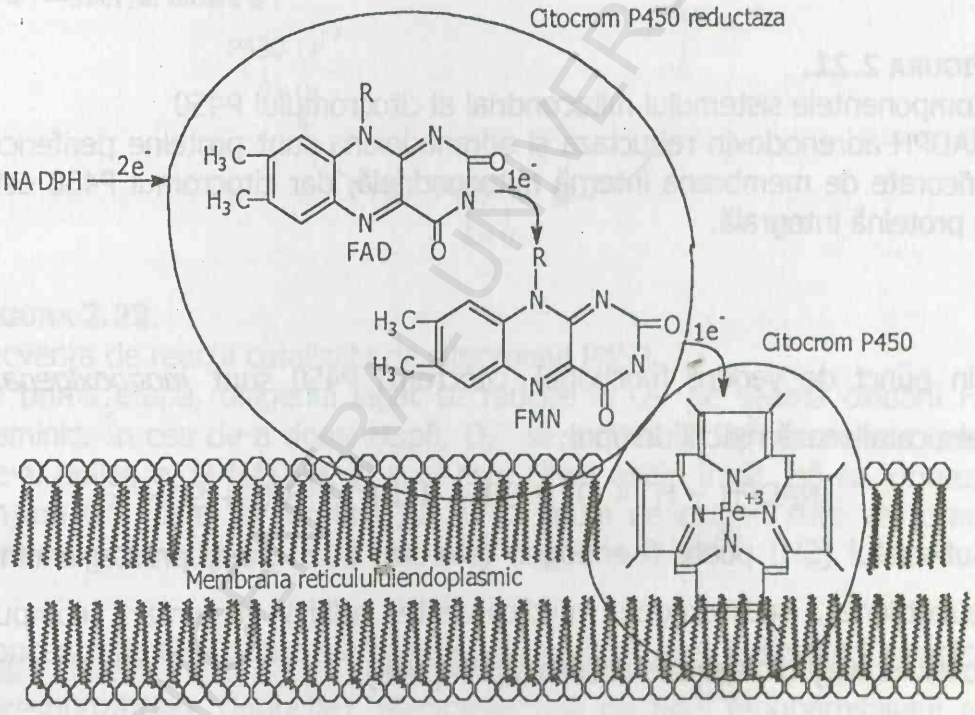


FIGURA 2.20.
Componentele sistemului microzomal al citocromului P450
NADPH-citocrom P450 reductaza este o proteină periferică, ancorată de membrană prin fragmentul hidrofob, în schimb citocromul P450 este o proteină integrală.

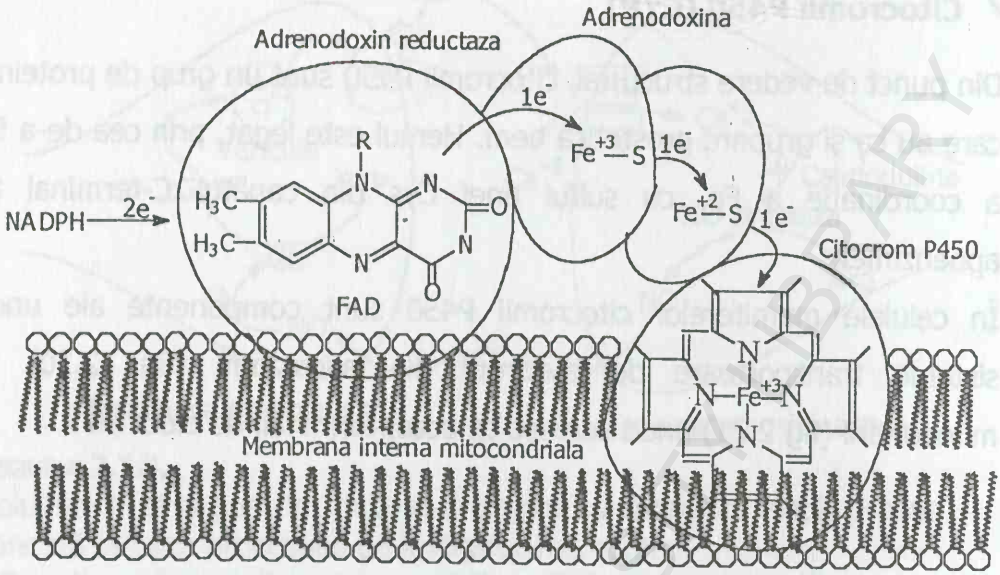


FIGURA 2.21.
Componentele sistemului mitocondrial al citocromului P450
NADPH-adrenodoxin reductaza şi adrenodoxina sunt proteine periferice, ancorate de membrana internă mitocondrială, dar citocromul P450 este o proteină integrală.

Din punct de vedere funcţional, citocromii P450 sunt *monooxigenaze* care catalizează reacţii de tipul:

$$NADPH + H^+ + O_2 + SH = NADP^+ + H_2O + SOH$$

Substratul (SH) poate fi endogen (steroizi, acizi graşi, prostaglandine, leucotriene), sau exogen (medicamente, aditivi alimentari, compuşi toxici inhalaţi din aer sau absorbiţi prin piele).

Legarea substratului la centrul activ al citocromului P450 determină o modificare conformaţională în buzunarul hemului care are ca efect modificarea potenţialului redox al Fe (de la –270mV la –170mV). Ca urmare, este accelerat transferul succesiv al celor 2 electroni de la NADPH. Preluarea primului electron determină reducerea Fe heminic la

Fe^{2+} şi astfel facilitează legarea oxigenului. Preluarea celui de-al doilea electron determină clivarea moleculei de oxigen în vederea inserţiei în substrat (fig. 2.22).

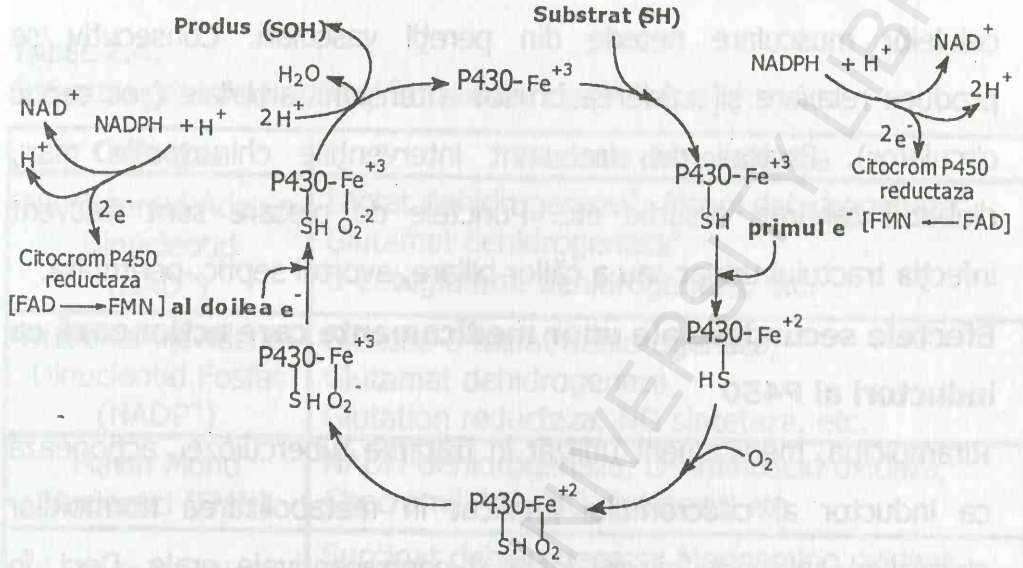


FIGURA 2.22.
Secvenţa de reacţii catalizate de citocromul P450.
În prima etapă, oxigenul legat se reduce la O_2^- pe seama oxidării Fe heminic. În cea de-a doua etapă, O_2^- se reduce la O_2^{2-} pe seama celui de-al doilea e^- al NADPH, şi apoi este clivat astfel încât să se formeze un ion O^{2-} (care va forma H_2O) şi un atom de oxigen care va forma gruparea hidroxilică.

Concentraţia CYP poate să crească prin intensificarea transcrierii genelor corespunzătoare (inducţie). Medicamentele de tipul fenobarbitalului se leagă de receptori specifici din citosol. Complexul inductor-receptor este translocat în nucleu unde, acţionând asupra unor secvenţe reglatoare determină activarea transcrierii. Consecutiv creşte concentraţia P450, şi implicit, creşte viteza de hidroxilare a xenobioticelor, proces care stă la baza inactivării şi/sau îndepărtării lor prin excreţie.

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

Semnificaţii clinice

✓ **Şocul septic**

Soşul septic este determinat de eliberarea masivă a toxinelor bacteriene. Acestea induc sinteza iNOS din macrofage. Ca urmare, se sintetizează o cantitate mare de NO care va acţiona şi asupra celulelor musculare netede din pereţii vasculari. Consecutiv se produce relaxare şi scăderea bruscă a tensiunii arteriale (şoc septic circulator). Factorii de risc sunt intervenţiile chirurgicale mari, diabetul zaharat, arsurile etc. Punctele de plecare sunt frecvent infecţia tractului urinar sau a căilor biliare, avortul septic, peritonita.

✓ **Efectele secundare ale unor medicamente care acţionează ca inductori ai P450**

Rifampicina, medicament utilizat în tratarea tuberculozei, acţionează ca inductor al citocromului implicat în metabolizarea hormonilor steroizi în categoria cărora intră şi contraceptivele orale. Deci, în acest caz se impune administrarea unor doze mai mari de anticoncepţional.

Alcoolul etilic induce sinteza citocromului responsabil de metabolizarea acetaminofenului, cu formarea unui compus hepatotoxic. De aceea, acest analgezic este contraindicat consumatorilor cronici de alcool.

Fenobarbitalul induce sinteza citocromului responsabil de metabolizarea warfarinei (anticoagulant). Ca urmare utilizarea acestui sedativ impune administrarea unor doze mai mari de anticoagulant pentru prevenirea formării nedorite a cheagurilor.

BCU PSYCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COFACTORI ORGANICI IMPLICAŢI ÎN TRANSFER DE E- + H^+

Cofactorii organici utilizaţi de enzimele care catalizează reacţiile de transfer de electroni (e^-) şi protoni (H^+) sunt prezentaţi în tabelul 2.4.

TABEL 2.4.
Cofactori organici implicaţi în transfer de [H^+ + e^-]

Cofactor	Enzime dependente
Nicotinamid Adenin Dinucleotid (NAD^+)	Lactat dehidrogenaza[a], Alcool dehidrogenaza[a], Glutamat dehidrogenaza[b], α-Cetoglutarat dehidrogenaza, etc.
Nicotinamid Adenin Dinucleotid Fosfat ($NADP^+$)	Glucozo 6-fosfat dehidrogenaza, Glutamat dehidrogenaza, Glutation reductaza, NO sintetaza, etc.
Flavin Mono Nucleotid (FMN)	NADH-dehidrogenaza, D-Aminoacid oxidaza, Citocromii P_{450}, NO-sintetaza, etc.
Flavin Adenin Dinucleotid (FAD)	Succinat dehidrogenaza, Monoamino oxidaza, Xantin oxidaza, Glucoz oxidaza, L-Aminoacid oxidaza, Citocromi P_{450}, NO-sintetaza, etc.
Tetrahidro biopterina (H_4B)	Fenilalanin hidroxilaza, Tirozin hidroxilaza, etc.
Acidul lipoic	Piruvat dehidrogenaza, α-Cetoglutarat dehidrogenaza, etc.
Acidul ascorbic (Vitamina C)	Dopamin hidroxilaza, Lizin hidroxilaza, Prolin hidroxilaza, Triptofan hidroxilaza, etc.
Vitamina K	Glutamat γ-carboxilaza
Coenzima Q sau Ubichinona (CoQ = UQ)	NADH-dehidrogenaza, Succinat dehidrogenaza, Acil-CoA dehidrogenaza, etc.

*a=dehidrogenază de tip A; b=dehidrogenază de tip B (vezi text).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

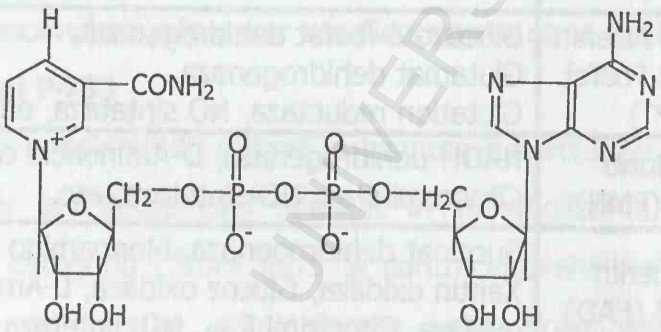
NICOTINAMID ADENIN DINUCLEOTID (NAD^+)
NICOTINAMID ADENIN DINUCLEOTID FOSFAT ($NADP^+$)

Structura

NAD^+ este un dinucleotid format din nicotinamid mononucleotid (NMP) şi adenin mononucleotid (AMP), legate prin legătura de tip anhidridă stabilită între grupările fosfat (fig. 2.23a).

$NADP^+$, spre deosebire de NAD^+, are o grupare fosfat suplimentară, esterificată cu hidroxilul din poziţia 2' a AMP (fig. 2.23b).

a).



b).

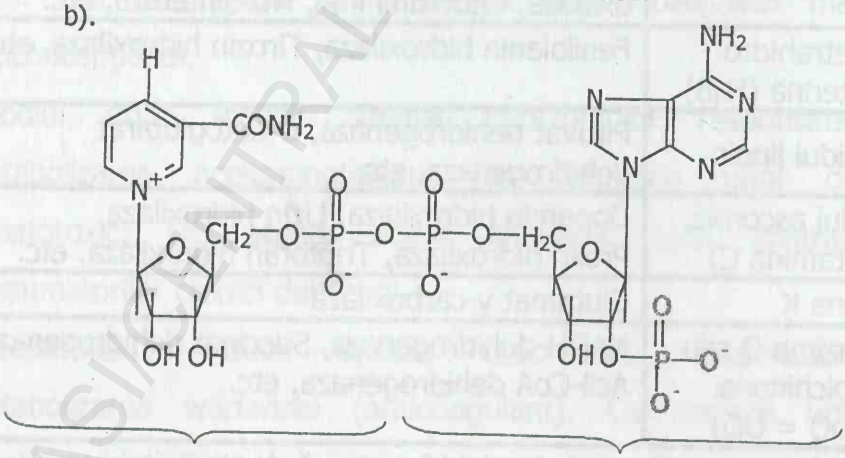


FIGURA 2.23.
a). Structura NAD^+=Nicotinamid Adenin Dinucleotid;
b). Structura $NADP^+$=Nicotinamid Adenin Dinucleotid Fosfat

Sinteza

NAD^+ şi $NADP^+$ se sintetizează pornind de la nicotinamidă, cunoscută ca vitamina pelagro-preventivă sau PP. În prima etapă se sintetizează nicotinamid mononucleotidul (NMP). Acesta este convertit în NAD^+ prin adenilare (transferul AMP), şi apoi în $NADP^+$ prin fosforilare (fig. 2.24).

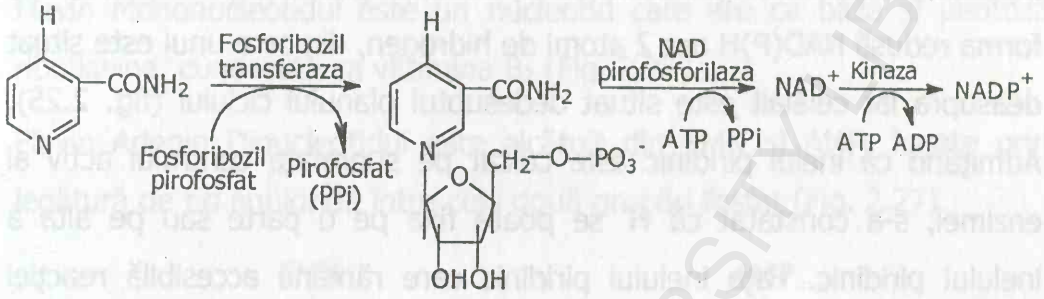
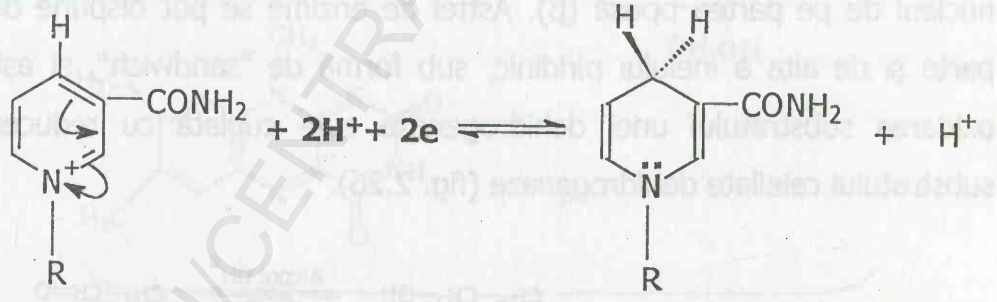


FIGURA 2.24.
Sinteza $NAD(P)^+$

Rol bilogic

Nucleul piridinic al nicotinamidei poate lega un ion H^- (respectiv $H^+ + 2e$) şi astfel $NAD(P)^+$ se reduce la NAD(P)H (fig. 2.25).



NAD^+= forma oxidata

NADH= forma redusa

FIGURA 2.25.
Reducerea stereospecifică $NAD(P)^+$

BCU ASICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

DEHIDROGENAZE NICOTINICE

$NAD(P)^+$ poate îndeplini rolul de coenzimă pentru unele dehidrogenaze (vezi tabel 2.4). Fiecare dehidrogenază $NAD(P)^+$ dependentă catalizează *transferul stereospecific* al echivalentului reducător (H^-) de pe substrat pe C_4 din ciclul piridinic al dinucleotidului. Forma oxidată $NAD(P)^+$ are în această poziţie un singur atom de H, situat în planul ciclului. În schimb, forma redusă NAD(P)H are 2 atomi de hidrogen, din care unul este situat deasupra iar celălalt este situat dedesubtul planului ciclului (fig. 2.25). Admiţând că inelul piridinic este culcat pe suprafaţa centrului activ al enzimei, s-a constatat că H^- se poate fixa pe o parte sau pe alta a inelului piridinic. Faţa inelului piridinic care rămâne accesibilă reacţiei depinde de dispoziţia grupării $-CO-NH_2$ şi a restului moleculei de $NAD(P)^+$, (notat cu R) faţă de zonele de pe suprafaţa enzimei responsabile de legarea lor. Dehidrogenazele piridinice cu *specificitate de tip A*, cum ar fi lactat dehidrogenaza, vor dehidrogena substratul ataşând H pe o faţă a inelului piridinic (α), în timp ce dehidrogenazele piridinice cu *specificitate de tip B*, cum ar fi glicerolfosfat dehidrogenaza, vor ataca nucleul de pe partea opusă (β). Astfel de enzime se pot dispune de-o parte şi de alta a inelului piridinic, sub formă de "sandwich", şi astfel oxidarea substratului unei dehidrogenaze este cuplată cu reducerea substratului celeilate dehidrogenaze (fig. 2.26).

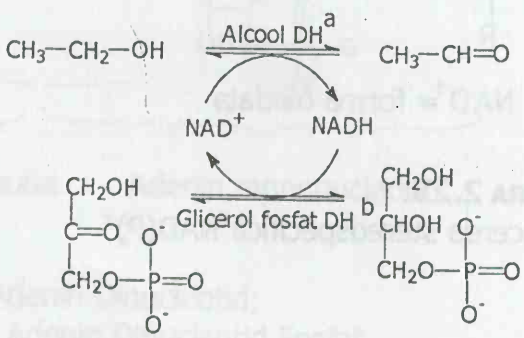


FIGURA 2.26.
Reacţiile catalizate de alcool dehidrogenază (de tip A) şi glicerolfosfat dehidrogenază (de tip B).

COFACTORI FLAVINICI

FLAVIN MONONUCLEOTID (FMN)
FLAVIN ADENIN DINUCLEOTID (FAD)

Structura

Flavin Mononucleotidul este un nucleotid care are ca bază şi pentoză riboflavina, cunoscută ca vitamina B_2 (Fig. 2.27).

Flavin Adenin Dinucleotidul este alcătuit din FMN şi AMP, legate prin legătură de tip anhidridă între cele două grupări fosfat (Fig. 2.27).

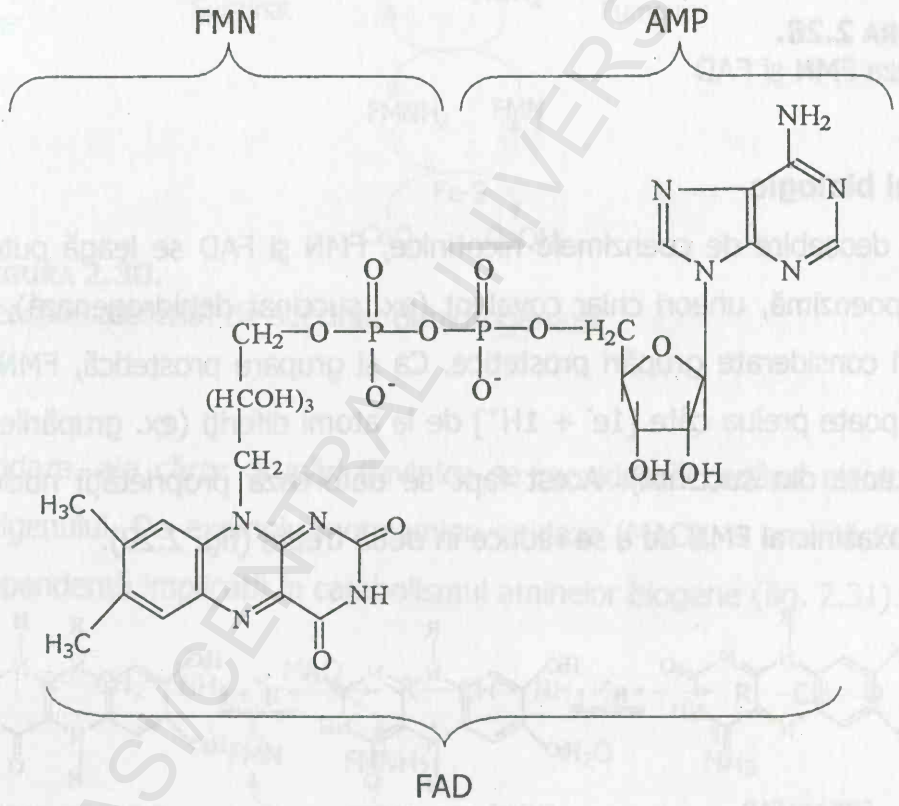


FIGURA 2.27.
Structura FMN şi FAD

BCU ASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sinteza

FMN se obţine prin fosforilarea riboflavinei, iar FAD se obţine prin adenilarea FMN (fig. 2.28).

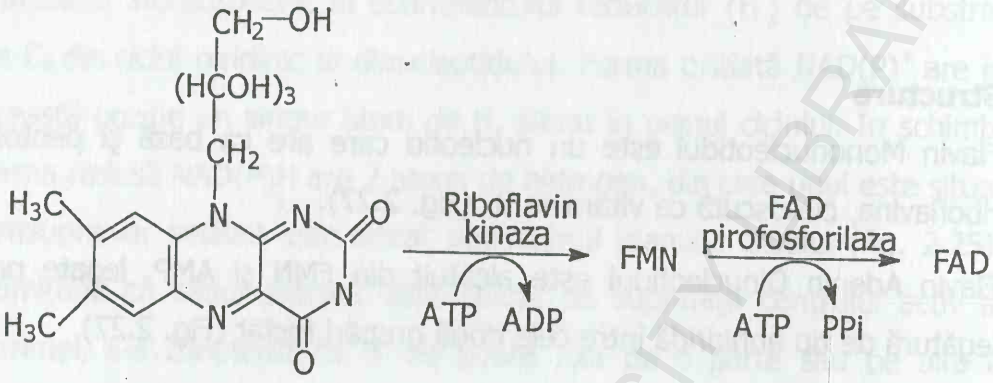


FIGURA 2.28.
Sinteza FMN şi FAD

Rolul biologic

Spre deosebire de coenzimele nicotinice, FMN şi FAD se leagă puternic de apoenzimă, uneori chiar covalent (ex. succinat dehidrogenază), deci pot fi considerate grupări prostetice. Ca şi grupare prostetică, FMN sau FAD poate prelua câte [$1e^- + 1H^+$] de la atomi diferiţi (ex. grupările CH_2 adiacente din succinat). Acest fapt se datorează proprietăţii nucleului izoaloxazinic al FMN de a se reduce în două trepte (fig. 2.29).

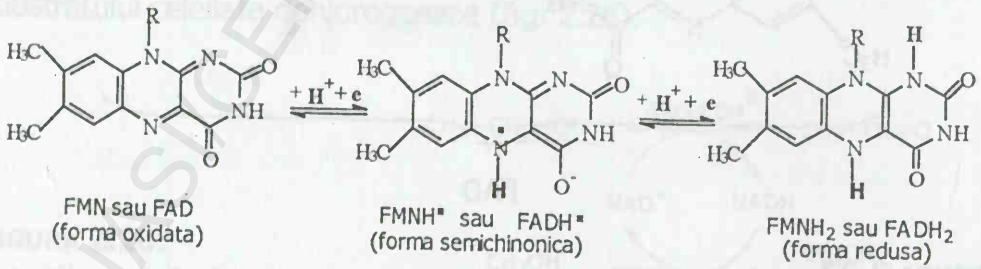


FIGURA 2.29.
Reducerea în trepte a coenzimelor flavinice

ENZIME FLAVINICE

Flavoenzimele se clasifică în două grupe:

a) dehidrogenaze, ale căror grupări flavinice se reoxidează cedând electronii altui transportor de electroni (ex. FMN, coenzima Q).

De exemplu succinat dehidrogenaza (fig. 2.30) componentă a lanţului transportor de electroni, din membrana internă mitocondrială.

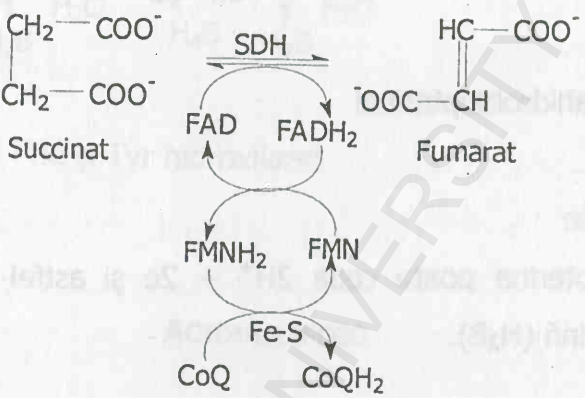


FIGURA 2.30.
Reacţia catalizată de succinat dehidrogenază

b) oxidaze, ale căror grupări flavinice se reoxidează cedând electronii oxigenului. De exemplu monoamino oxidaza (MAO), o enzimă FMN-dependentă implicată în catabolismul aminelor biogene (fig. 2.31).

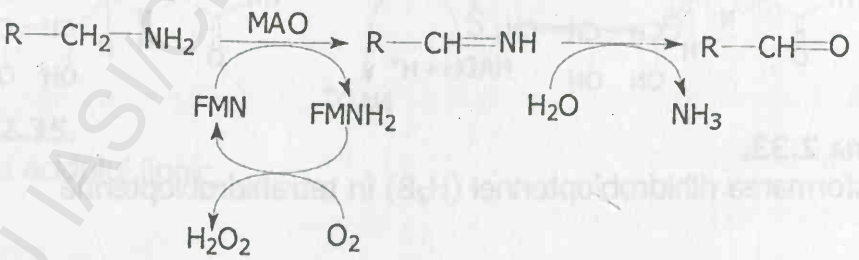


FIGURA 2.31.
Reacţia catalizată de monoamino oxidază

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TETRAHIDROBIOPTERINA (H_4B)

Structura

Tetrahidrobiopterina este un derivat pteridinic (fig. 2.32).

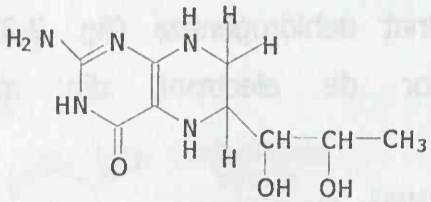


FIGURA 2.32.
Structura tetrahidrobiopterinei

Rolul biologic

Tetrahidrobiopterina poate ceda $2H^+ + 2e$ şi astfel se transformă în dihidrobiopterină (H_2B).

Sinteza

Deoarece H_4B poate fi sintetizată din GTP, doar în cantitate limitată, se impune refacerea sa permanentă prin reducerea H_2B, sub acţiunea dihidropteridin reductazei, o enzimă NADH-dependentă (Fig. 2.33).

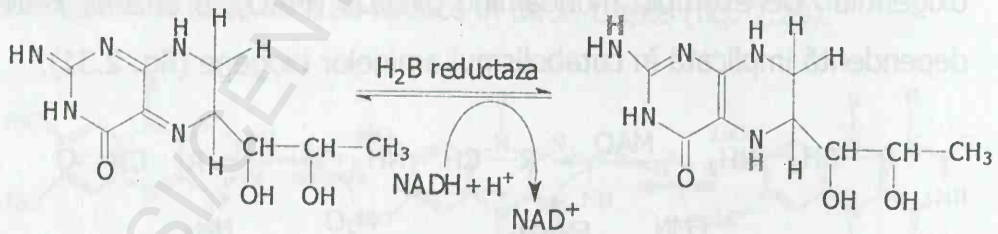


FIGURA 2.33.
Transformarea dihidrobiopterinei (H_2B) în tetrahidrobiopterină

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ENZIME DEPENDENTE DE H_4B

H_4B îndeplineşte rol de coenzimă pentru: fenilalanin hidroxilază, tirozin hidroxilază (fig. 2.34) şi triptofan hidroxilază. Aceste enzime sunt monooxigenaze implicate în sinteza neoromediatorilor: DOPA, noradrenalină, respectiv serotonină.

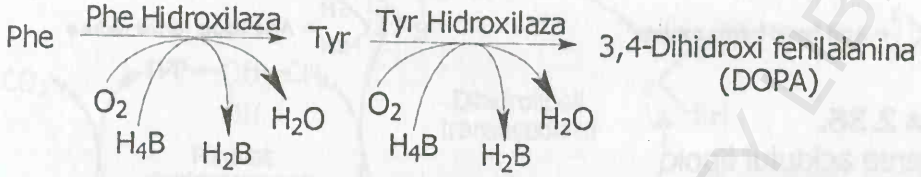


FIGURA 2.34.
H_4B = coenzimă a Phe şi Tyr hidroxilazei

ACIDUL LIPOIC

Structura

Acidul lipoic este acidul tioctic sau 6,8-ditio-octanoic(fig. 2.35).

Poate fi sintetizat din glucide şi proteine, deci nu necesită un precursor vitaminic.

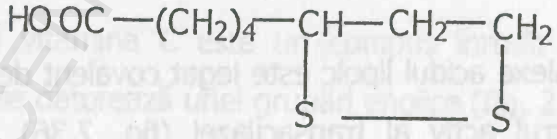


FIGURA 2.35.
Structura acidului lipoic

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rolul biologic

Acidul lipoic poate accepta electroni şi protoni şi astfel se transformă în acid dihidrolipoic (fig. 2.36).

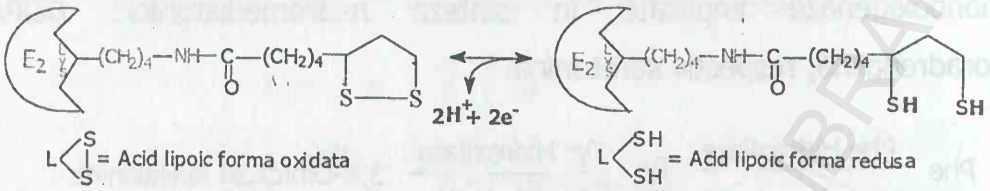


FIGURA 2.36.
Reducerea acidului lipoic

ENZIME DEPENDENTE DE ACIDUL LIPOIC

Acidul lipoic îndeplineşte rolul de grupare prostetică a transacilazei, enzimă componentă a două complexe multienzimatice similare: piruvat dehidrogenaza şi α-cetoglutarat dehidrogenaza (fig. 2.37).

E_1—TPP = Piruvat (a-cetoglutarat) dehidrogenaza
E_2—L(S—S) = Dihidrolipoil transacetilaza
E_3—FAD = Dihidrolipoil dehidrogenaza

FIGURA 2.37.
Componentele complexului piruvat (α-cetoglutarat) dehidrogenazei

În aceste complexe acidul lipoic este legat covalent de gruparea ε-NH_2 a lizinei din centrul activ al transacilazei (fig. 2.36). Astfel, partea sa "activă" (care posedă puntea disulfidică) se găseşte la extremitatea unui braţ mobil capabil să preia gruparea acetil de pe tiamin pirofosfat, gruparea prostetică a dehidrogenazei (fig. 2.38).

BCU FSC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

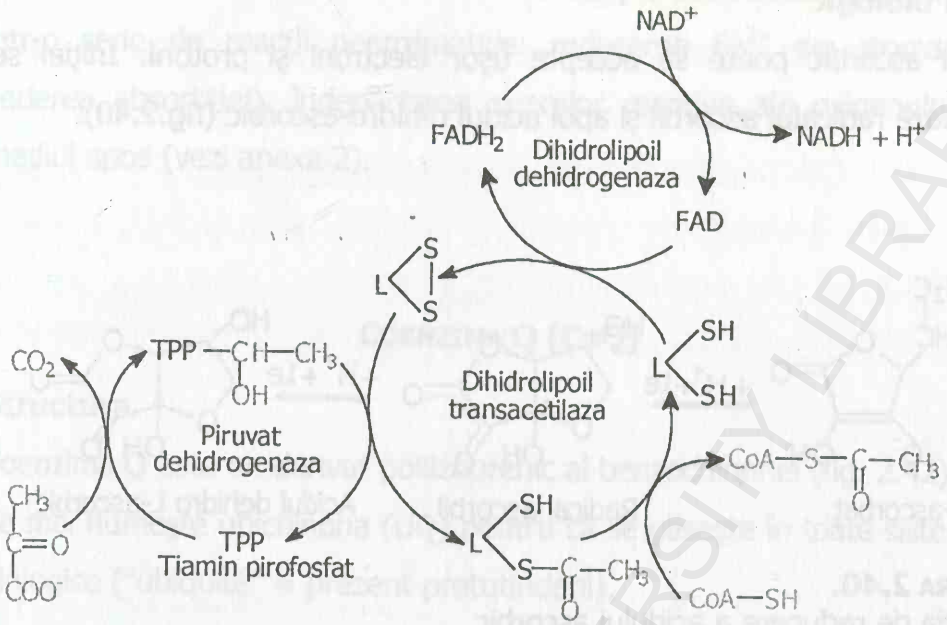


FIGURA 2.38.
Reacţiile catalizate de complexul enzimatic al piruvat dehidrogenazei

VITAMINA C (ACIDUL ASCORBIC)

Structura

Acidul ascorbic sau vitamina C este un compus înrudit cu hexozele. Caracterul său acid se datorează unei grupări enolice (fig. 2.39).

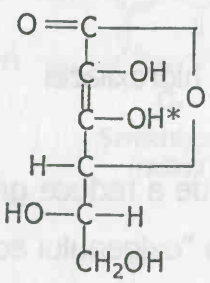
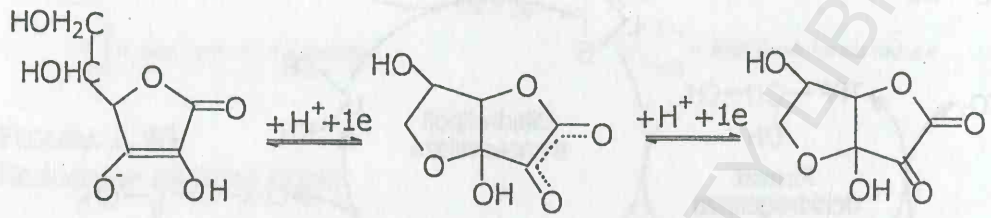


FIGURA 2.39.
Structura acidului L-ascorbic
(asterixul indică gruparea enolică disociată, la pH fiziologic)

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Rolul biologic

Acidul ascorbic poate să accepte uşor electroni şi protoni. Iniţial se formează radicalul ascorbil şi apoi acidul dihidro-ascorbic (fig.2.40).

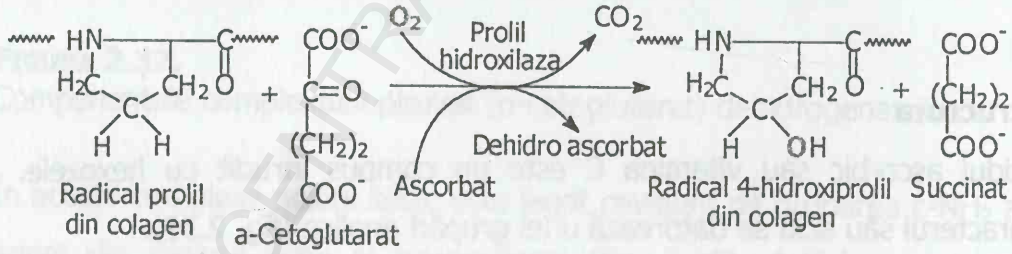


L-ascorbat Radical ascorbil Acidul dehidro L-ascorbic

FIGURA 2.40.
Reacţia de reducere a acidului ascorbic

ENZIME DEPENDENTE DE ACIDUL ASCORBIC

Datorită proprietăţilor sale redox, acidul ascorbic îndeplineşte rol de coenzimă pentru unele hidroxilaze (tabel 2.4 şi fig. 2.41).



Radical prolil din colagen a-Cetoglutarat Radical 4-hidroxiprolil din colagen Succinat

FIGURA 2.41.
Vitamina C coenzimă a prolil hidroxilazei

În această calitate are rolul de a reduce gradul de oxidare al cofactorilor metalici implicaţi în formarea "oxigenului activ" (vezi rolul Cu).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În plus, datorită caracterului său reducător, L-ascorbatul este implicat într-o serie de reacţii neenzimatice: reducerea Fe^{3+} din stomac (în vederea absorbţiei), îndepărtarea speciilor reactive ale oxigenului din mediul apos (vezi anexa 2).

COENZIMA Q (CoQ)

Structura

Coenzima Q este un derivat poliizoprenic al benzochinonei (fig. 2.42).
Se mai numeşte ubichinona (UQ) pentru că se găseşte în toate sistemele biologice ("ubiquité" = prezent pretutindeni).

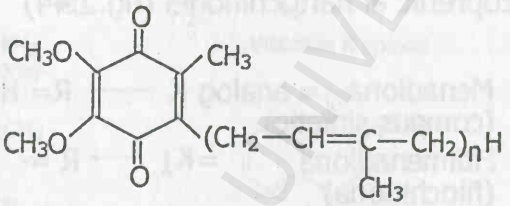


FIGURA 2.42.
Structura coenzimei Q (n=8-10).

Rolul biologic

Coenzima Q poate accepta, în două etape, H^+ şi electroni. Astfel se transformă în semichinonă şi apoi în hidrochinonă. (fig. 2.43).

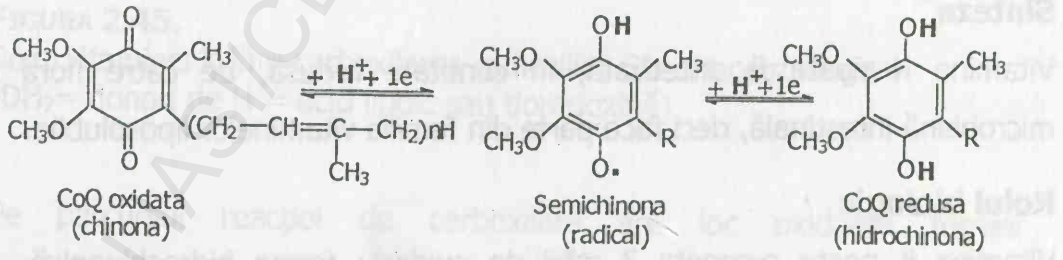


FIGURA 2.43.
Reducerea coenzimei Q

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ENZIME DEPENDENTE DE COENZIMA Q

Datorită radicalului poliizoprenil CoQ este solubilă în lipide. Această proprietate explică rolul de componentă "mobilă" a lanţului transportor de electroni (din membrana internă mitocondrială). În această calitate, CoQ preia 2 electroni şi 2 protoni de la flavin dehidrogenaze (NADH dehidrogenază, succinat dehidrogenază, acil-CoA dehidrogenază) şi trimite câte un electron citocromului b (vezi lanţul respirator).

VITAMINA K

Structura

Este un derivat poliizoprenic al naftochinonei (fig.2.44)

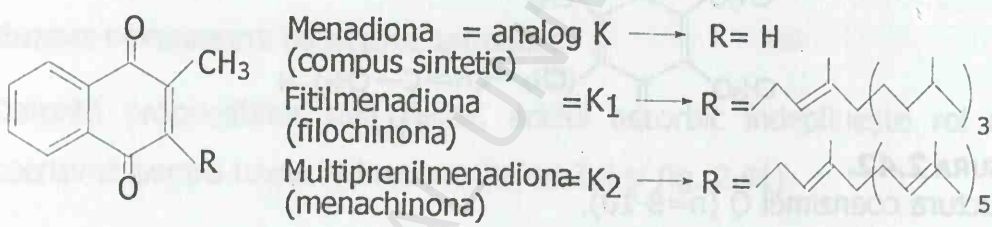


FIGURA 2.44.
Structura vitaminei K

Sinteza

Vitamina K poate fi sintetizată, în cantitate redusă, de către flora microbiană intestinală, deci face parte din familia vitaminelor liposolubile.

Rolul biologic

Vitamina K poate prezenta 3 stări de oxidare: forma hidrochinonică, forma de epoxid, şi forma chinonică (fig. 2.45), ca urmare poate participa la reacţii redox.

BCUA SIBIU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ENZIME DEPENDENTE DE VITAMINA K

Vitamina K este singura vitamină liposolubilă care îndeplineşte rolul de coenzimă, şi anume este coenzima γ-glutamil carboxilazei. Această enzimă acţionează asupra radicalilor glutamil (Glu) dintr-o serie de proteine implicate în coagularea sângelui: protrombina (Factor II), proteina C, proteina S, precursorii factorilor VII, IX, X (fig. 2.45), precum şi din alte proteine (ex. osteocalcina din oase).

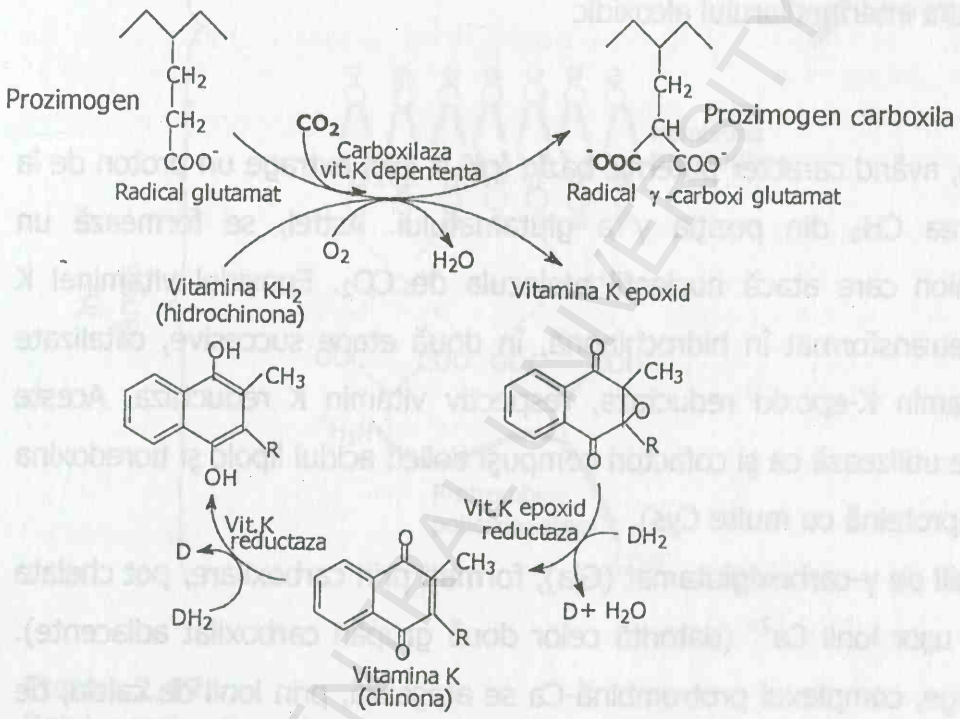


FIGURA 2.45.
Rolul vitaminei K în γ-carboxilarea radicalilor Glu din prozimogeni
(DH_2= donori de H = acid lipoic sau tioredoxină)

Pe parcursul reacţiei de carboxilare are loc oxidarea formei hidrochinonice a vitaminei K. Se admite că, în prima etapă, se leagă o

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

moleculă de oxigen la C_1 şi apoi, prin rearanjare, se formează un intermediar alcoxidic (vezi fig. 2.46).

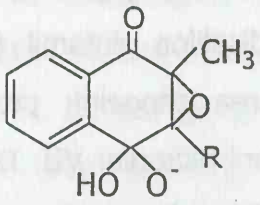


FIGURA 2.46.
Structura intermediarului alcoxidic

Acesta, având caracter puternic bazic ($pK_a \approx 20$), extrage un proton de la gruparea CH_2 din poziţia γ a glutamatului. Astfel, se formează un carbanion care atacă nucleofil molecula de CO_2. Epoxidul vitaminei K este retransformat în hidrochinonă, în două etape succesive, catalizate de vitamin K-epoxid reductaza, respectiv vitamin K reductaza. Aceste enzime utilizează ca şi cofactori compuşi tiolici: acidul lipoic şi tioredoxina (microproteină cu multe Cys).

Radicalii de γ-carboxiglutamat (Gla), formaţi prin carboxilare, pot chelata foarte uşor ionii Ca^{2+} (datorită celor două grupări carboxilat adiacente). În sânge, complexul protrombină-Ca se ataşează, prin ionii de calciu, de fosfolipidele din membrana trombocitelor. Ataşarea de trombocite intensifică viteza de conversie proteolitică a protrombinei în trombină (fig. 2.47).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

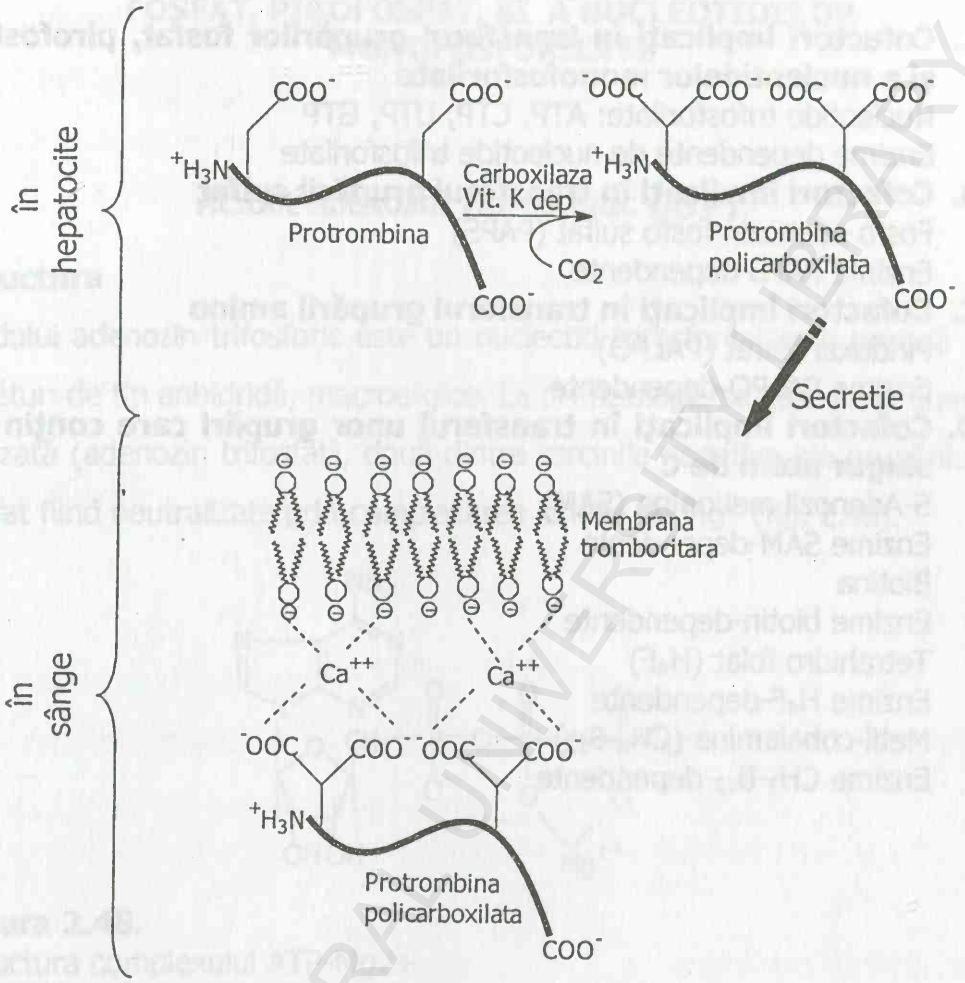


FIGURA 2.47.
Rolul γ-carboxilazei în coagularea sângelui

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN TRANSFERUL UNOR GRUPĂRI

A. Cofactori implicaţi în transferul grupărilor fosfat, pirofosfat, şi a nucleotidelor monofosforilate

Nucleotide trifosforilate: ATP, CTP, UTP, GTP

Enzime dependente de nucleotide trifosforilate

B. Cofactori implicaţi în transferul grupării sulfat

Fosfo adenozin fosfo sulfat (PAPS)

Enzime PAPS-dependente

C. Cofactori implicaţi în transferul grupării amino

Piridoxal fosfat (PALPO)

Enzime PALPO-dependente

D. Cofactori implicaţi în transferul unor grupări care conţin un singur atom de C

S-Adenozil metionina (SAM)

Enzime SAM-dependente

Biotina

Enzime biotin-dependente

Tetrahidro folat (H_4F)

Enzime H_4F-dependente

Metil-cobalamina (CH_3-B_{12})

Enzime CH_3-B_{12}-dependente

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

A. COFACTORI IMPLICAŢI ÎN TRANSFERUL GRUPĂRILOR FOSFAT, PIROFOSFAT, ŞI A NUCLEOTIDELOR MONOFOSFORILATE

ACIDUL ADENOZIN TRIFOSFORIC (ATP)

Structura

Acidului adenozin trifosforic este un nucleotid trifosforilat care posedă 2 legături de tip anhidridă, macroergice. La pH fiziologic se găseşte în stare ionizată (adenozin trifosfat), două dintre sarcinile negative ale grupărilor fosfat fiind neutralizate prin complexarea ionului de Mg^{2+}(fig. 2.48).

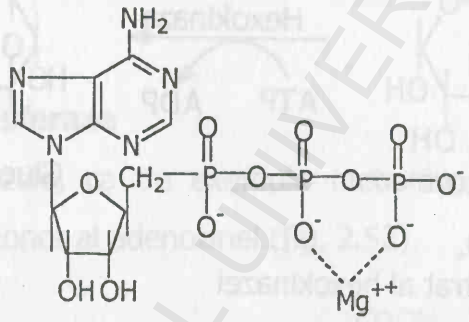


Figura 2.48.
Structura complexului ATP-Mg2+

Sinteza

ATP poate fi sintetizat din ADP prin:

- transferul fosfatului din compuşi macroergici de tipul 1,3-bisfogliceratului, fosfoenolpiruvatului (catalizat de kinazele respective);
- transferul fosfatului de pe o altă moleculă de ADP (catalizat de adenilat kinază sau miokinază);
- fosforilare cuplată cu lanţul respirator (catalizată de ATP sintetază).

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rolul biologic

ATP poate îndeplini funcţia de cofactor în reacţiile de transfer a grupărilor γ-fosfat, pirofosfat, AMP, precum şi a adenozinei.

ENZIME DEPENDENTE DE ATP

✓ **Kinaze**

Kinazele utilizează ATP ca şi donor al grupării γ-fosfat. De exemplu hexokinaza fosforilează orice hexoză, inclusiv glucoza (fig. 2.49).

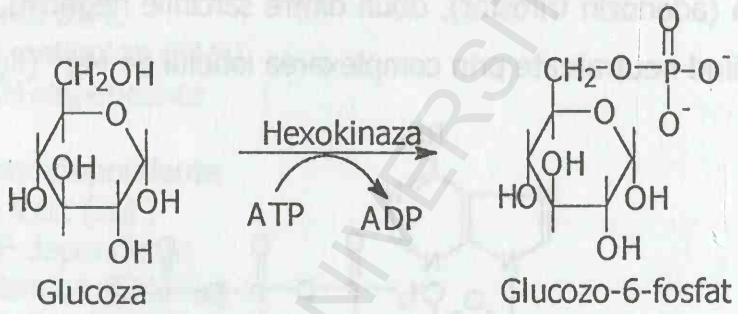


Figura 2.49.
ATP=cosubstrat al hexokinazei

✓ **Pirofosfokinaze**

Pirofosfokinazele utilizează ATP ca donor al grupării pirofosfat (PPi). De exemplu, ribozo-5-fosfat pirofosfokinaza pirofosforilează ribozo-5-fosfatul (fig. 2.50).

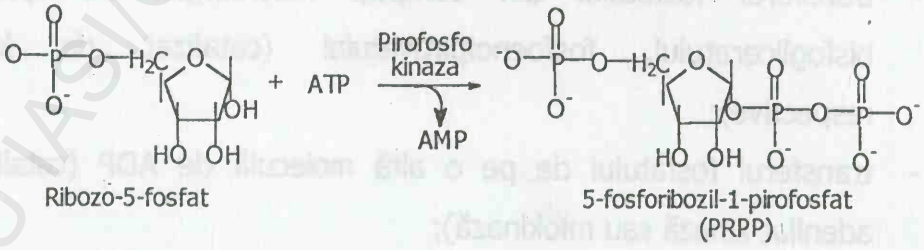


Figura 2.50.
ATP=cosubstrat al ribozo-5-fosfat pirofosfokinazei

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ **Sintaze (sintetaze)**

Unele sintaze utilizează ATP ca donor al AMP. De exemplu aminoacil-ARNt sintetaza catalizează formarea aminoacil-AMP, care apoi este transformat în aminoacil-ARNt (fig. 2.51).

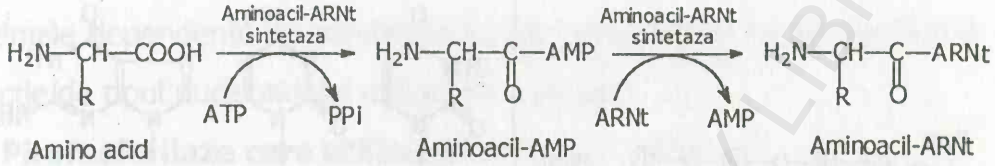


Figura 2.51.
ATP=cosubstrat în reacţia de transfer a AMP

✓ **Adenozil transferaze**

Adenozil transferazele, ca de exemplu metionin adenozil transferaza, utilizează ATP ca donor al adenozinei (fig. 2.52).

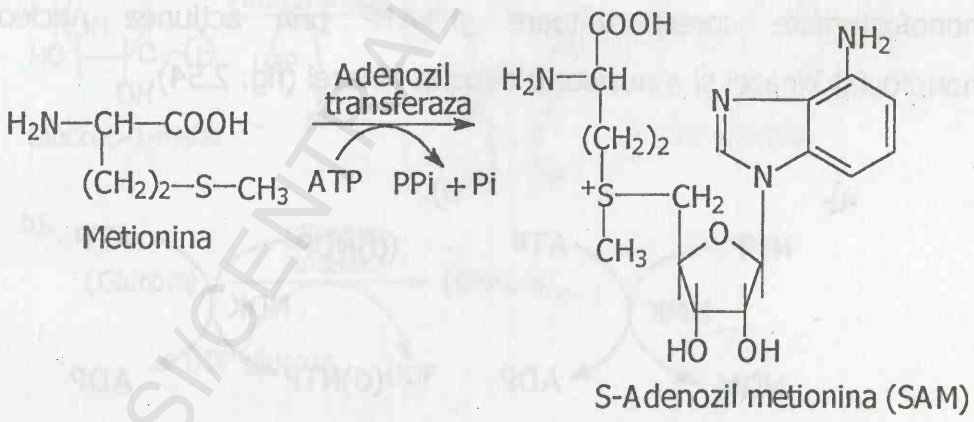


Figura 2.52.
ATP=cosubstrat în reacţia de transfer a adenozinei

BCU "SIGENTAL" UNIVERSITY LIBRARY

Structura

Acizii uridin trifosforic (UTP), citidin trifosforic (CTP) şi guanozin trifosforic (GTP) se deosebesc de ATP prin structura bazei (fig. 2.53).

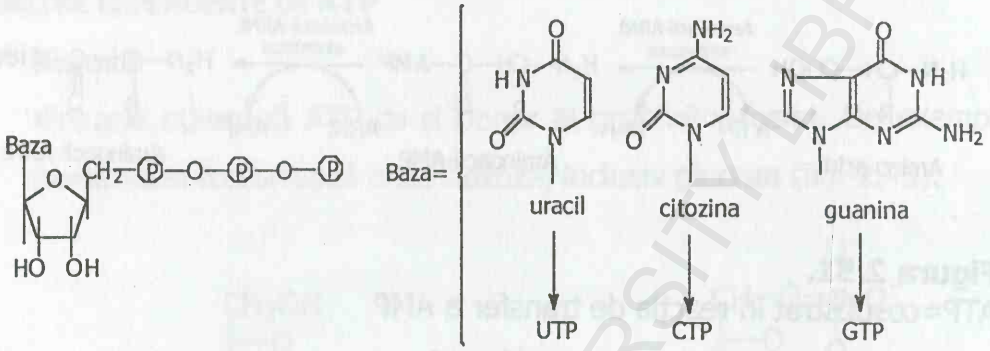


Figura 2.53.
Structura UTP, CTP, GTP

Sinteza

Aceste nucleotide trifosforilate se sintetizează din nucleotidele monofosforilate corespunzătoare şi ATP prin acţiunea nucleozid monofosfat kinazei şi a nucleozid difosfat kinazei (fig. 2.54).

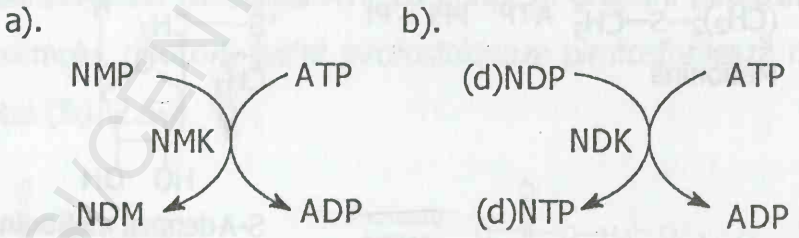


Figura 2.54.
Reacţiile catalizate de nucleozid monofosfat kinază (NMK) şi nucleozid difosfat kinază (NDK).

BCU "ASICENTRA" UNIVERSITY LIBRARY

Rolul biologic

Aceste nucleotide trifosforilate pot fi donori de UMP, CMP, respectiv GMP în reacţii catalizate de pirofosforilaze sau transferaze (vezi mai jos).

ENZIME DEPENTE DE UTP, CTP ŞI GTP

Enzimele dependente de aceste nucleotide trifosforilate se pot clasifica în funcţie de tipul nucleotidului utilizat, în 3 grupe:

✓ **Pirofosforilaze care utilizează UTP** (fig. 2.55).

Acestea au ca substrat: glucozo-1-fosfatul, hexozaminele N-acilate, şi sunt implicate în formarea "intermediarilor activi" (UDP-Glc, UDP-Hexozamine-N-acilate) utilizaţi în sinteza glicogenului, glicoproteinelor şi a proteoglicanilor;

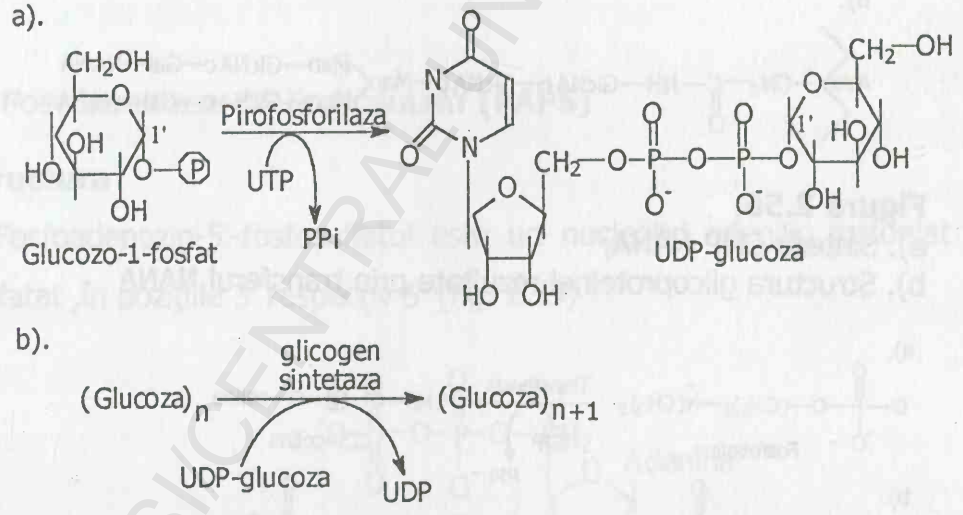


Figura 2.55.
a) Sinteza UDP-glucozei
b) UDP-glucoza cosubstrat al glicogen sintetazei

BCU "SIGENTRAL" UNIVERSITY LIBRARY

✓ **Pirofosforilaze sau transferaze care utilizează CTP** (fig. 2.56 şi fig. 2.57).

Aceste enzime au ca substrat: acidul N-acetil neuraminic (NAcNeu), alţi acizi sialici, acidul fosfatidic; fosfoetanol amina, fosfocolina, şi sunt implicate în formarea "intermediarilor activi" (CMP-NAcNeu, CDP-diacilglicerol, CDP-etanolamină, CDP-colină) utilizaţi în sinteza glicoproteinelor, respectiv a lipidelor;

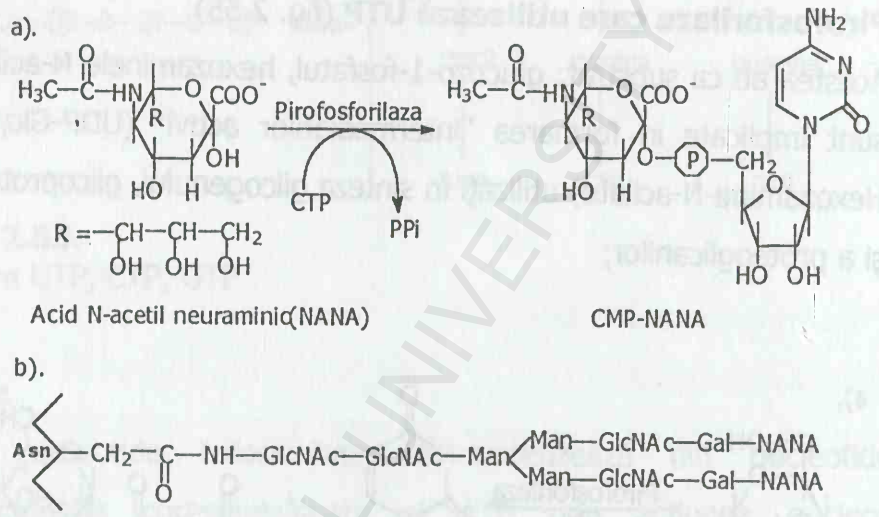


Figura 2.56.
a). Sinteza CMP-NANA;
b). Structura glicoproteinei rezultate prin transferul NANA

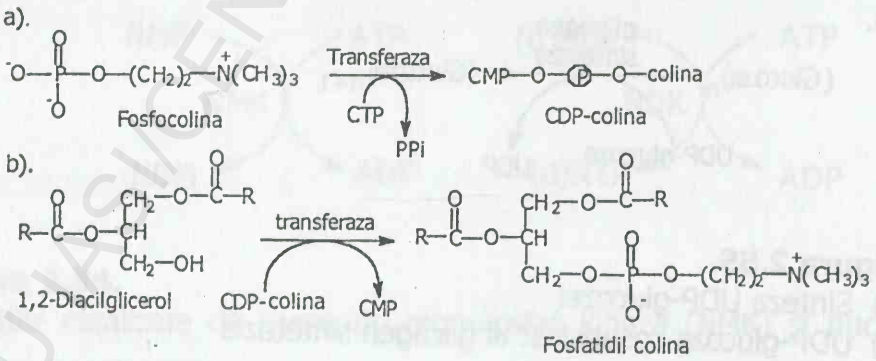


Figura 2.57.
a) Sinteza CDP-colinei;
b) Utilizarea CDP-colinei în sinteza fosfatidil colinei

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ **Pirofosforilaze care utilizează GTP** (fig. 2.58).

Acestea au ca substrat: manozo-1-fosfatul, fucozo-1-fosfatul, şi sunt implicate în formarea "intermediarilor activi (GDP-manoză, GDP-fucoză) utilizaţi în sinteza glicoproteinelor.

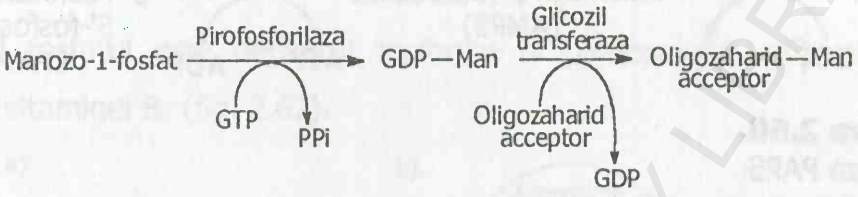


Figura 2.58.
Sinteza şi rolul GDP-manozei ;

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN TRANSFERUL GRUPĂRII SULFAT

3'-FOSFOADENOZIN-5'-FOSFOSULFAT (PAPS)

Structura

3'-Fosfoadenozin-5'-fosfosulfatul este un nucleotid adenilic fosforilat şi sulfatat ,în poziţiile 3' respectiv 5' (fig. 2.59)

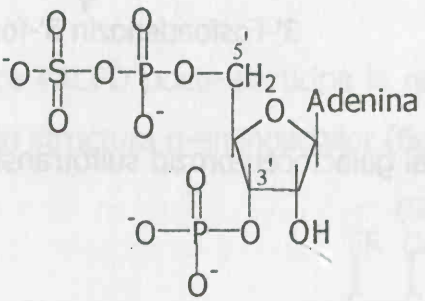


Figura 2.59.
Structura PAPS

BUJIASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sinteza

PAPS se sintetizează din ATP, prin acţiunea succesivă a ATP sulfurazei şi a AMPS kinazei (fig. 2.60).

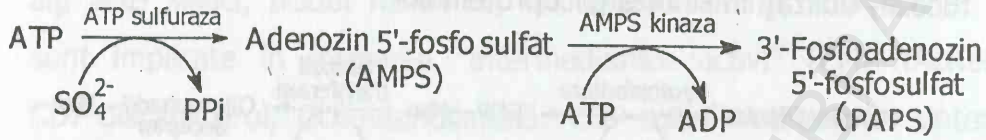


Figura 2.60.
Sinteza PAPS

Rolul biologic

Deoarece gruparea sulfat este legată de gruparea fosfat din poziţia 5′ printr-o legătură de tip anhidridă, PAPS reprezintă o forma activă a sulfatului. Ca urmare, PAPS este cofactor în reacţiile catalizate de sulfotransferaze.

ENZIME PAPS DEPENDENTE

Enzimele PAPS-dependente, numite sulfotransferaze, sunt enzime implicate în sinteza sulfatidelor (fig. 2.61).

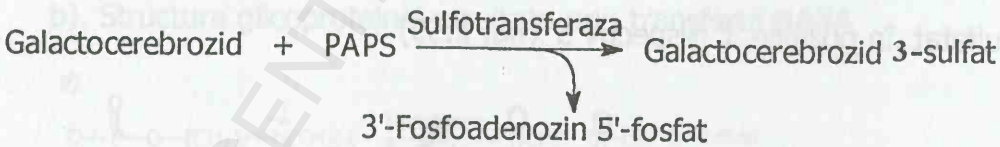


Figura 2.61.
PAPS=cosubstrat al galactocerebrozid sulfotransferazei

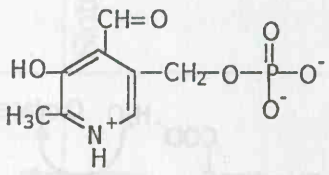
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PIRIDOXAL FOSFAT (PALPO)

Structura

Piridoxal fosfatul este derivatul fosforilat al piridoxalului, una dintre formele vitaminei B_6 (fig. 2.62).

a).



b).

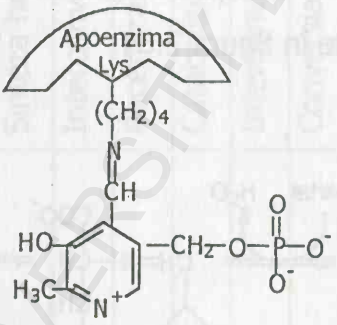


Figura 2.62.
a) Structura PALPO;
b) PALPO=grupare prostetică legată de apoenzimă prin legătură covalentă (dar şi prin interacţiuni ionice şi hidrofobe);

Sinteza

PALPO se obţine din piridoxal (vitamina B_6) şi ATP, prin acţiunea unei kinaze specifice

Rolul biologic

Datorită grupării aldehidice PALPO poate participa la reacţii de clivare & formare a unor legături din structura α-aminoacizilor (fig. 2.63).

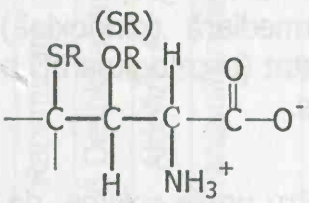


Figura 2.63.
Legăturile clivate sau formate prin acţiunea enzimelor PALPO-dependente.
(vezi legăturile roşii, îngroşate)

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PALPO este grupare prostetică pentru variate **enzime implicate în metabolismul aminoacizilor, precum şi în transformarea aminoacizilor în amine biogene, sfingolipide, hem**, etc. (tabel 5).

De exemplu, aspartat transaminaza (ASAT, GOT) utilizează PALPO pentru transferul grupării amino de la aminoacidul donor (Asp) la α-cetoacidul acceptor (α-cetoglutaric). Etapele transformării sunt prezentate în figura 2.64.

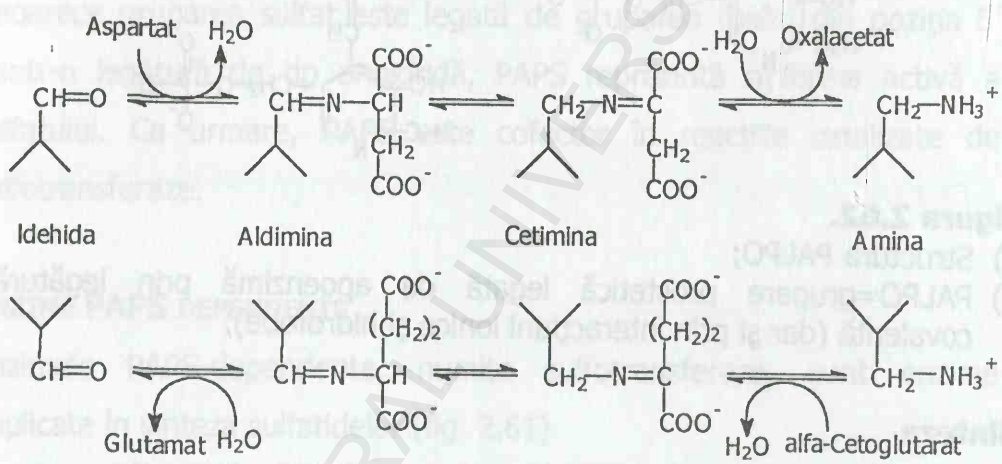


Figura 2.64.
Reacţia de transaminare catalizată de aspartat transaminaza (ASAT sau GOT).

De remarcat că în prima etapă, gruparea aldehidică a piridoxalului se condensează cu gruparea amino a aspartatului (primul substrat al enzimei). Condensarea este urmată de rearanjarea aldimină-cetimină cu convertirea grupării aldehidice în grupare amino. Această stare intermediară (piridoxină) va iniţia transformarea celui de-al doilea substat (α-cetoglutarat) printr-o succesiune de reacţii desfăşurate în sens opus.

Pentru unele enzime, de exemplu glicogen fosforilaza, PALPO este doar activator, fără a fi direct implicat în procesul catalitic.

Tabel 2.5. Transformări PALPO dependente

Tipul reacţiei	Exemple	Importanţa
Transaminare	Asp+α-Cetoglurat=Oxalacetat+Glu Ala+α-Cetoglurat=Piruvat+Glu	Metabolismul aminoacizilor
α-Decarboxilare	Glu=CO_2+γ-Aminobutirat (GABA) His=CO_2+Histamina 5-Hidroxi-Trp=CO_2+Serotonina 3,4-Didroxi-Phe (Dopa)=CO_2+Dopamina Ornitina=CO_2+Putresceina	Sinteza aminelor biogene
	Ser+Palmitoil-CoA=CO_2+CoA+3-Cetosfinganina	Sinteza sfingolipidelor
	Gly+Succinil-CoA=CO_2+CoA+δ-ALA	Sinteza hemului
β-Decarboxilare	Asp=CO_2+Ala	Interconversia Asp-Ala
Racemizare	L-Aminoacid=D-Aminoacid	Racemizarea aminoacizilor
α-β Deshidratare	Ser=H_2O+NH_4+Piruvat	Catabolismul serinei
Aldolizare	Ser=Acetaldehida+Gly	Interconversia Ser-Gly
"Transsulfurare"	Homocysteina+Ser=Cistationina Cistationina+H_2O=Cys+NH_4+α-cetobutirat	Conversia homocisteinei în Cys

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN TRANSFERUL GRUPĂRILOR CU UN ATOM DE C

S-Adenozil metionina (SAM)
Biotina
Tetrahidro folat (H_4F)
Metil-cobalamina (CH_3-B_{12})

S-ADENOZIL METIONINA (SAM)

Structura

S-Adenozil metionina este un derivat al 5'-deoxiadenozinei şi al metioninei (fig. 2.65).

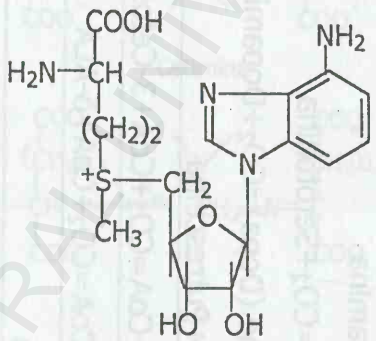


Figura 2.65.
Structura SAM

Sinteza

SAM se obţine prin adenozilarea Met (vezi rolul ATP, fig. 2.52)

Rolul biologic

SAM poate fi donor al grupărilor amino şi propilamino, în reacţiile catalizate de transferazele specifice.

BCU "BABEŞ-BOLYAI" UNIVERSITY LIBRARY

ENZIME SAM-DEPENDENTE

Enzimele SAM-dependente sunt

- ✓ **N-Metil transferazele** implicate în metilarea proteinelor şi acizilor nucleici;
- ✓ **N-Metil transferazele** implicate în transformarea:
  - noradrenalinei în adrenalină (fig. 2.66);
  - guanidin-acetatului în creatină;
  - fosfatidil-etanolaminei în fosfatidil-colină;
- ✓ **Propilamino transferazele** implicate în sinteza spermidinei şi sperminei, poliamine implicate în controlul sintezei acizilor nucleici şi a proteinelor (fig.2.67).

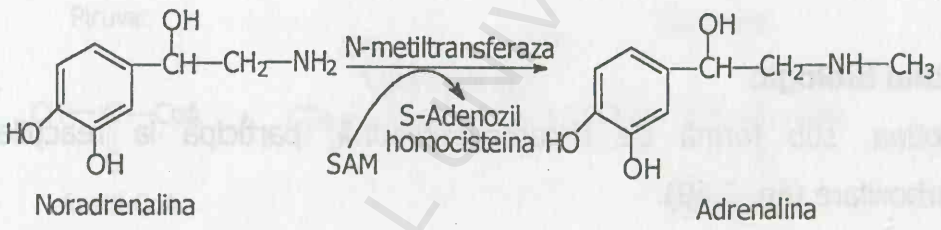


Figura 2.66.
SAM=cosubstrat în reacţia de metilare a noradrenalinei

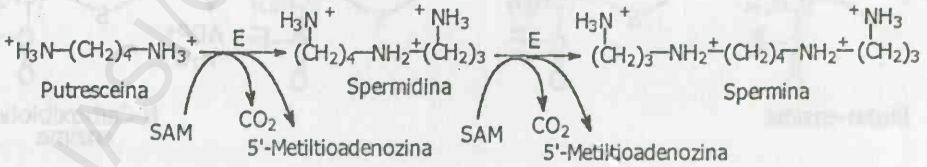


Figura 2.67.
SAM=cosubstrat în sinteza poliaminelor; E=propilamino transferaza.

BU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura

Biotina, o vitamină hidrosolubilă, este formată dintr-un nucleu imidazolonic condensat cu tetrahidrotiofen (Fig. 2.68).

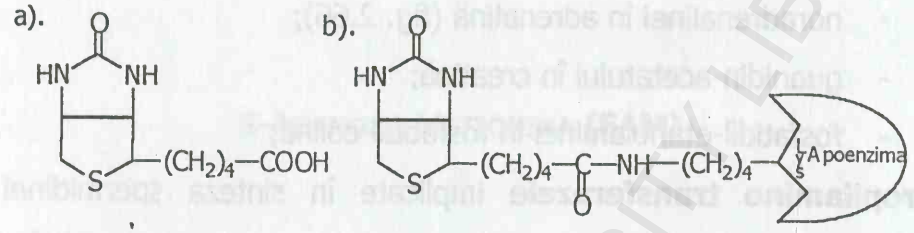


Figura 2.68.
a) Structura biotinei
b) Biotina=grupare prostetică

Rolul biologic

Biotina, sub formă de N-carboxi biotină, participă la reacţiile de carboxilare (fig. 2.69).

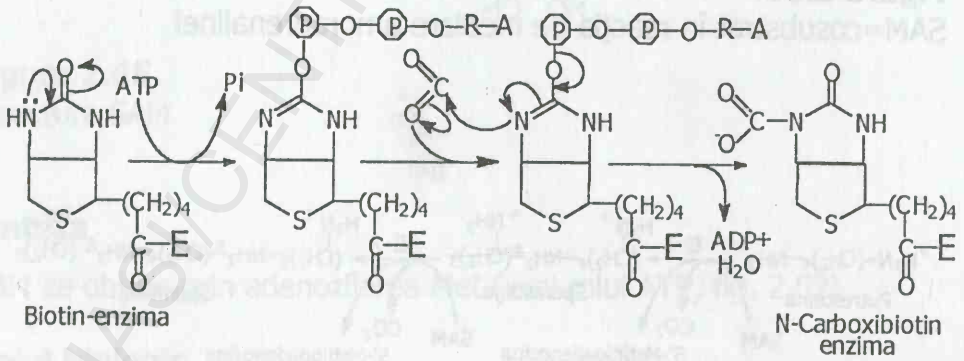


Figura 2.69.
Mecanismul "activării CO_2", sau al formării N-carboxi-biotinei, sub acţiunea carboxilazei

ENZIME BIOTIN-DEPENDENTE

Principalele enzime biotin-dependente sunt:

- ✓ **piruvat carboxilaza;**
- ✓ **acetil-CoA carboxilaza;**
- ✓ **propionil-CoA carboxilaza.**

Spre deosebire de carboxilaza dependentă de vitamina K, aceste carboxilaze introduc o grupare carboxil la carbonul din poziţia β a piruvatului, respectiv din poziţia α a acetil- şi propionil-CoA (fig. 2.70).

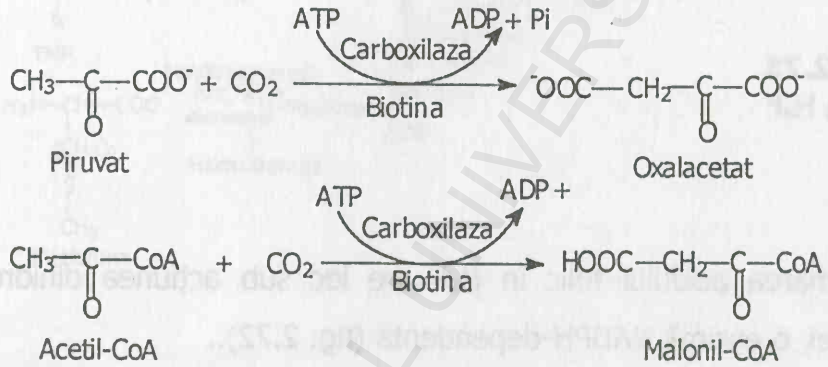


Figura 2.70.
Biotina=grupare prostetică a piruvat carboxilazei şi a acetil-CoA carboxilazei

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura

Acidul tetrahidrofolic sau tetrahidropteroil poliglutamic este derivatul acidului folic (pteroil poliglutamic), o vitamină hidrosolubilă (fig. 2.71).

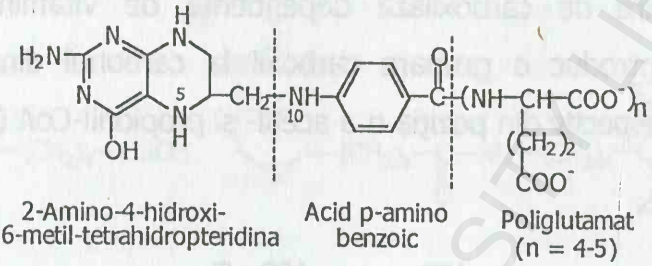


Figura. 2.71
Structura H_4F

Sinteza

Transformarea acidului folic în H_4F are loc sub acţiunea dihidrofolat reductazei, o enzimă NADPH-dependentă (fig. 2.72)..

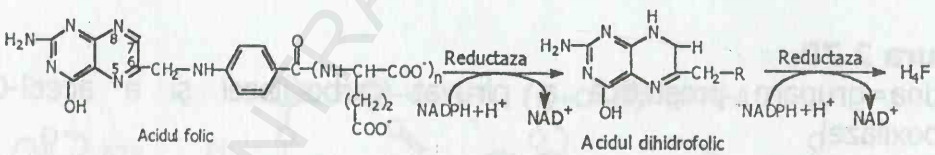


Figura. 2.72
Sinteza H_4F

Rolul biologic

Acidul tetrahidrofolic preia, de la diverse substrate, grupări care conţin un singur atom de carbon: metil, metilen, metenil, formil. Aceşti derivaţi ai H_4F sunt utilizaţi ca sursă de "grupări C_1 active" (fig. 2.73).

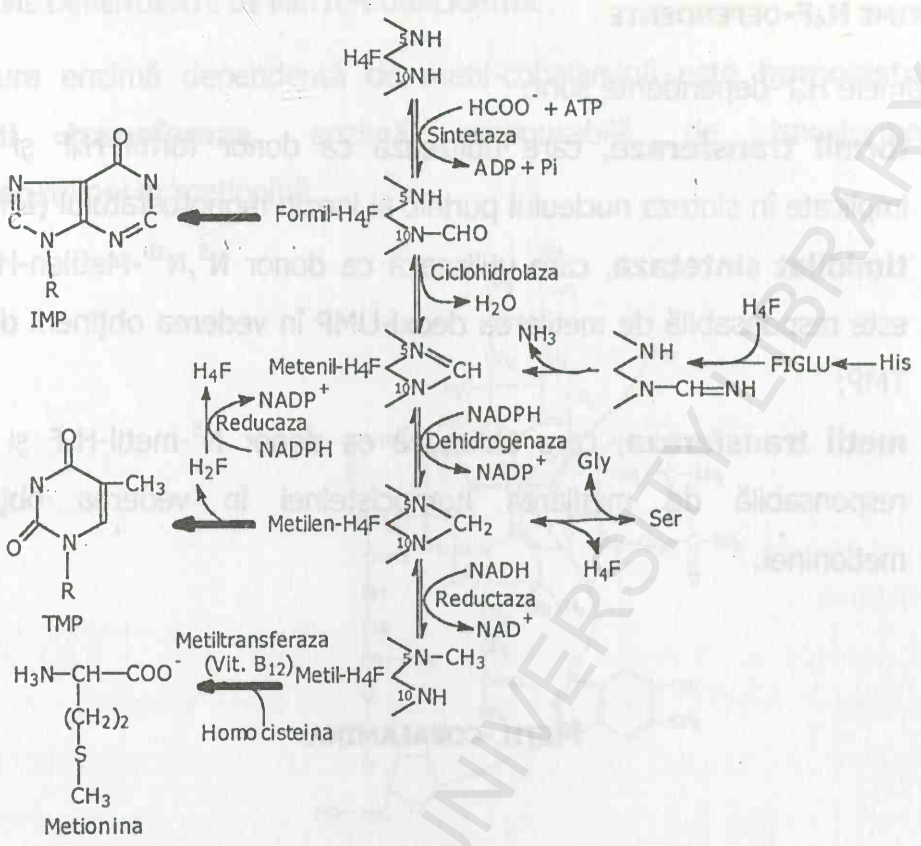


Figura 2.73.
Proveniența și interconversia derivaților H_4F; rolul acestor derivați în metabolismul aminoacizilor și al nucleotidelor;
TMP=acidul timidin monofosforic (nucleotid pirimidinic);
IMP=acidul inozin monofosforic (precursor al nucleotidelor purinice);
FIGLU=acidul formimino glutamic.

Grupările cu un carbon transferate de H_4F sunt atașate fie la N^5 sau N^{10}, fie formează o punte între N_5 și N_{10}. Când sunt atașate de H_4F aceste grupări pot fi oxidate sau reduse. Cea mai oxidată formă, N^{10}-formil-H_4F eliberează H_2O și formează N^5,N^{10}-metenil-H_4F. Reducerea acestei forme produce N^5,N^{10}-metilen-H_4F și apoi N^5-metil-H_4F.

BCU "ASICENTRAL" UNIVERSITY LIBRARY

ENZIME H_4F-DEPENDENTE

Enzimele H_4F-dependente sunt:

- ✓ **formil transferaze**, care utilizează ca donor formil-H_4F şi sunt implicate în sinteza nucleului purinic al inozin monofosfatului (IMP);
- ✓ **timidilat sintetaza**, care utilizează ca donor N^5,N^{10}-Metilen-H_4F şi este responsabilă de metilarea deoxi-UMP în vederea obţinerii deoxi-TMP;
- ✓ **metil transferaza**, care utilizează ca donor N^5-metil-H_4F şi este responsabilă de metilarea homocisteinei în vederea obţinerii metioninei.

METIL-COBALAMINA

Structura

Metil-cobalamina este derivatul metilat al cobalaminei cunoscută ca vitamina B_{12} (fig. 2.74).

Sinteza

Metil-cobalamina se sintetizează printr-o reacţie catalizată de transferaza specifică, folosind CH_3-H_4F ca donor al grupării metil.

Rolul biologic

Metil-cobalamina este donor al grupării metil în reacţia de S-metilare a homocisteinei (fig. 2.75).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ENZIME DEPENDENTE DE METIL-COBALAMINĂ

Singura enzimă dependentă de metil-cobalamină este **homocistein-metil transferaza**, enzimă responsabilă de transformarea homocisteinei în metionină.

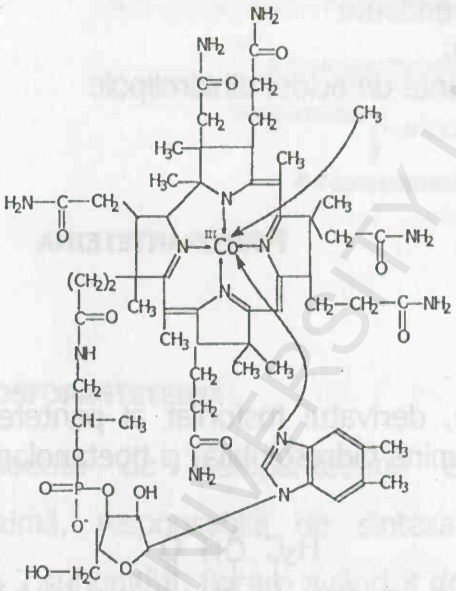


FIGURA 2.74.
Structura metil-cobalaminei

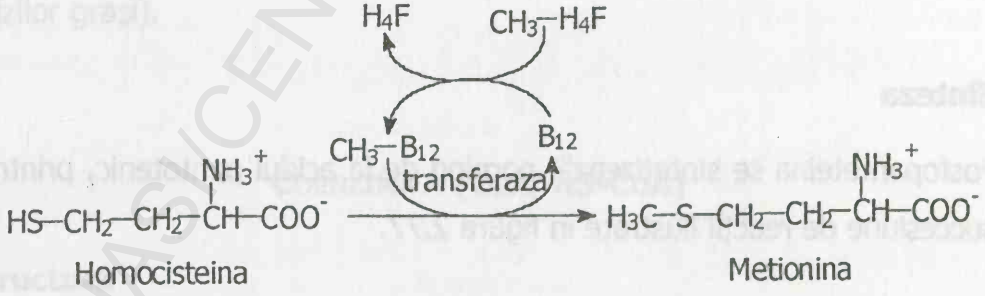


FIGURA 2.75.
Reacţia catalizată de homocistein metiltransferază, enzimă metil-cobalamin dependentă

BUMF CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN TRANSFERUL GRUPĂRILOR CARE AU MAI MULŢI ATOMI DE C

Fosfopanteteina
Enzime dependente de fosfopanteină
Coenzima A (CoA)
Enzime Coa-dependente
Acid dihidrolipoic
Enzime dependente de acidul dihidrolipoic

FOSFOPANTETEINA

Structura

Fosfopanteteina, derivatul fosforilat al panteteinei, are la bază acidul pantotenic (vitamină hidrosolubilă) şi tioetanolamina (fig. 2.76).

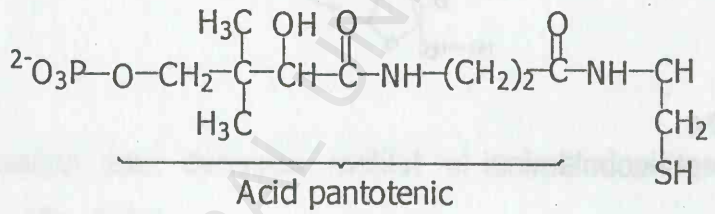


FIGURA 2.76.
Structura fosfopanteteinei

Sinteza

Fosfopanteteina se sintetizează, pornind de la acidul pantotenic, printr-o succesiune de reacţii ilustrate în figura 2.77.

Rolul biologic

Datorită grupării SH, fosfopanteina poate forma legături tioester, macroergice. Ca urmare, are rolul de a activa & transporta grupări acil.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

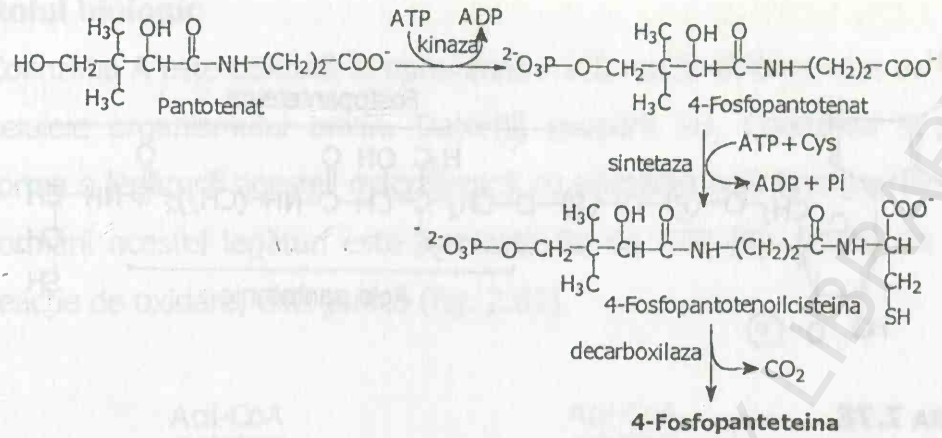


FIGURA 2.77.
Sinteza fosfopanteteinei

ENZIME DEPENDENTE DE FOSFOPANTETEINĂ

Singura enzimă dependentă de fosfopanteteină este **palmitat sintetaza.** Această enzimă, responsabilă de sinteza acizilor graşi saturaţi, este formată din 2 subunităţi, fiecare având 8 domenii. Fosfatul fosfopanteteinei este esterificat cu hidroxilul unei serine din *"proteina transportoare de acil" (ACP)*, singurul domeniu care nu conţine un centru catalitic. ACP foloseşte panteteina ca braţ mobil care leagă acidul malonic şi intermediarii formaţi prin transformarea acestuia (vezi sinteza acizilor graşi).

COENZIMA A (CoA; HS-CoA)

Structura

Coenzima A este formată din 4-fosfopanteteină şi 3'-fosfoadenozin 5'-monofosfat (fig. 2.78).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

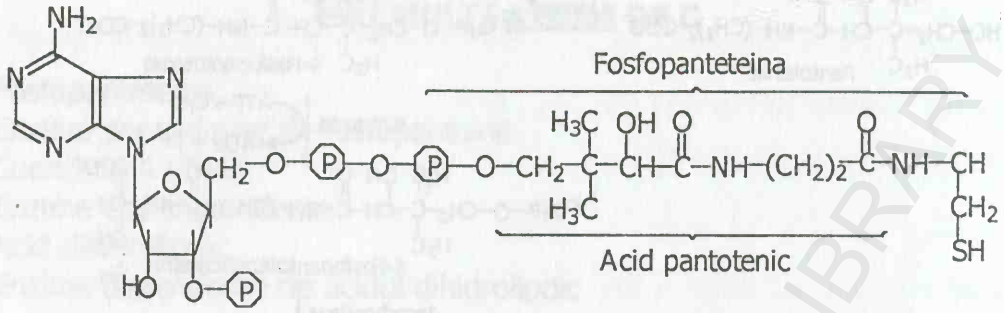


FIGURA 2.78.
Structura Coenzimei A

Sinteza

Coenzima A poate fi sintetizată din acid pantotenic, cisteină şi ATP. Primele reacţii sunt comune cu cele prezentate la sinteza fosfopanteteinei, de aceea în fig. 2.79. sunt prezentate doar reacţiile care vizează transformarea fosfopanteteinei în CoA.

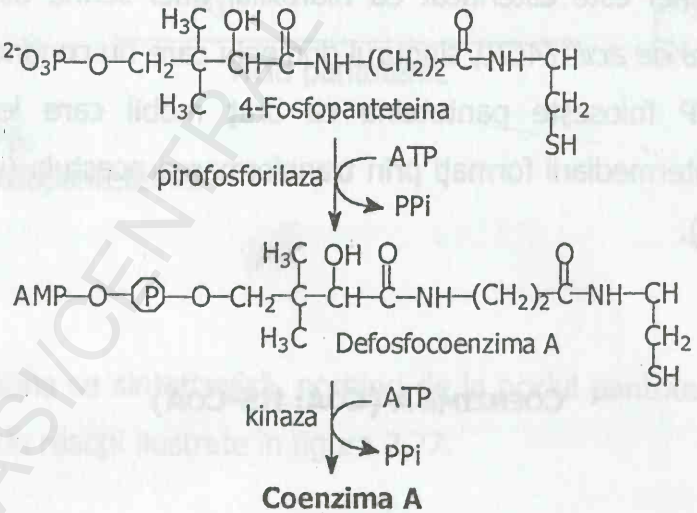


FIGURA 2.79.
Transformarea fosfopanteteinei în Coenzima A

BCU IASI CENTRUL DE UNIVERSITY LIBRARY

Rolul biologic

Coenzima A este utilizată în aproximativ 100 reacţii diferite care au loc în celulele organismului uman. Datorită grupării SH, Coenzima A poate forma o legătură tioester macroergică cu gruparea acil. Energia necesară formării acestei legături este furnizată fie de ATP (fig. 2.80), fie de o reacţie de oxidare, exergonică (fig. 2.81).

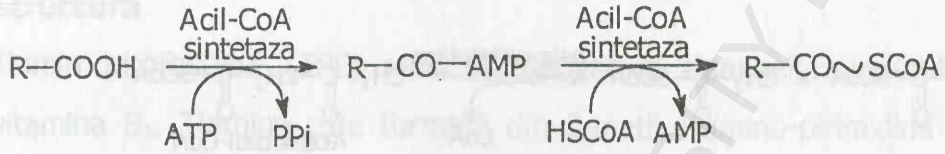


FIGURA 2.80.
Rolul CoA în activarea acizilor

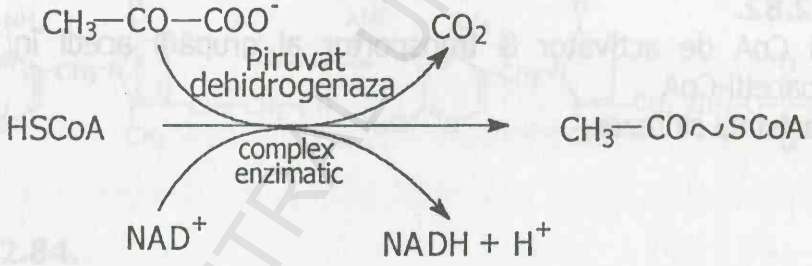


FIGURA 2.81.
Cuplarea sintezei acetil-CoA cu decarboxilarea oxidativă a piruvatului

ENZIME COA-DEPENDENTE

Energia legăturii tioester poate fi utilizată pentru formarea unei legături C-C, respectiv pentru formarea unei legături macroergice de tip anhidridă. De exemplu:

✓ **B-Cetotiolaza**, care catalizează reacţia ilustrată în figura 2.82;

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- ✓ **Succinat tiokinaza,** care catalizează reacţia ilustrată în figura 2.83;
- ✓ **Acil-CoA sintetaza,** care catalizează reacţia ilustrată în figura 2.80;
- ✓ **Dihidrolipoil transacilaza,** componentă a complexelor multienzimatice implicate în decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor, de exemplu a acidului piruvic (vezi fig. 2.81 şi rolul TPP).

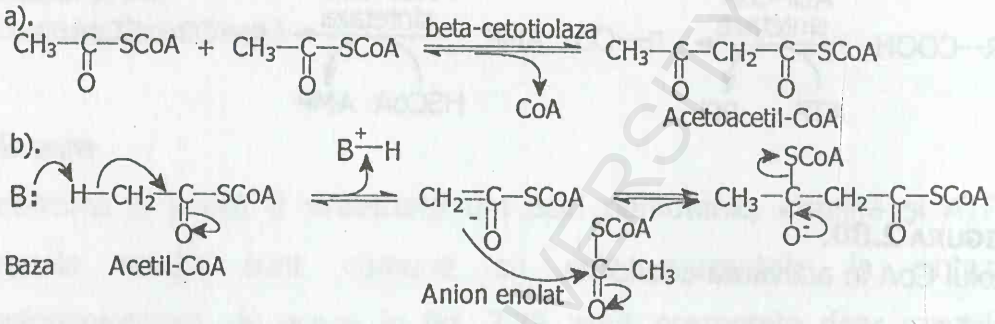


FIGURA 2.82.
a) Rolul CoA de activator & transportor al grupării acetil în sinteza acetoacetil-CoA
b) Mecanismul sintezei

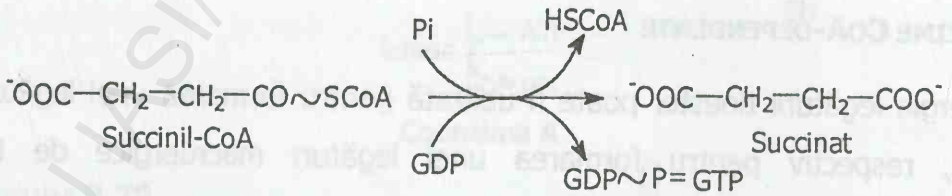


FIGURA 2.83.
Reacţia catalizată de succinat tiokinază (energia legăturii macroergice din succinil-CoA este utilizată pentru sinteza GTP)

BCU ASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN CLIVAREA LEGĂTURILOR C-C ŞI C-X

Tiamin Pirofosfat (TPP)
Enzime TPP-dependente

TIAMIN PIROFOSFAT (TPP)

Structura

Tiamin pirofosfatul (TPP) este un derivat al tiaminei, cunoscută ca vitamina B_1. Tiamina este formată din 2-metil-4-amino-pirimidină şi 4-metil-5-hidroxi-tiazoli, legaţi printr-o punte metilenică (fig. 2.84).

Sinteza

TPP este obţinut prin pirofosforilarea vitaminei B_1 (fig. 2.84).

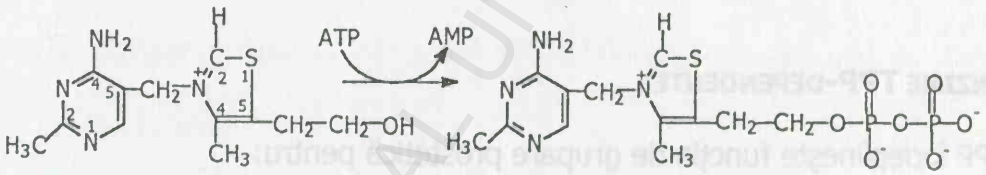


FIGURA 2.84.
Structura şi sinteza TPP
(observaţi poziţia "hidrogenului activ", legat de carbonul din poziţia 2 a ciclului tiazolic)

Rolul biologic

TPP intervine în clivarea legăturii C-C, ca în cazul decarboxilării α-cetoacizilor. Această proprietate se datorează "hidrogenului activ" din nucleul tiazolic, uşor de extras de către o grupare bazică din centrul activ al apoenzimei (fig. 2.85).

BUJ/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

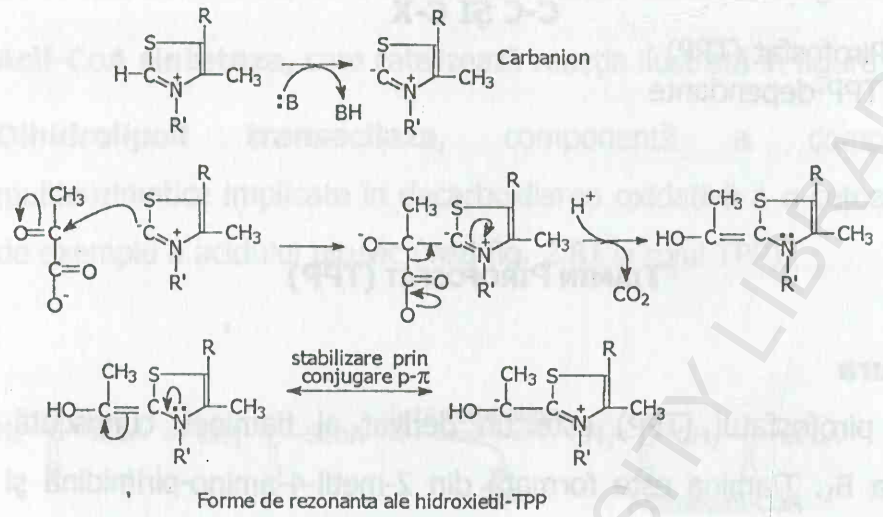


FIGURA 2.85.
Mecanismul decarboxilării piruvatului; atacul carbanionului, format prin extragerea "hidrogenului activ", asupra grupării carbonilice a piruvatului facilitează eliberarea CO_2.

ENZIME TPP-DEPENDENTE

TPP îndeplineşte funcţia de grupare prostetică pentru:

✓ **transcetolază**, enzimă care catalizează reacţii de tipul celei ilustrate în figura 2.86;

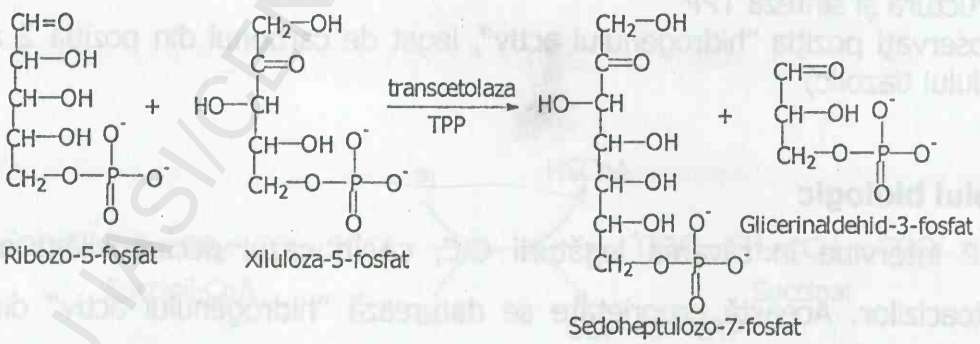


FIGURA 2.86.
TPP este implicat în scindarea legăturii C_2-C_3 şi transferul grupării formată din 2C de la substratul donor (cetoza fosforilată) la substratul acceptor (aldoza fosforilată).

RAU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ **α-Cetoacid decarboxilază (dehidrogenază),** respectiv enzima E_1 din complexele multienzimatice ale α-cetoacid dehidrogenazelor . De exemplu, complexul piruvat dehidrogenazei şi complexul α-cetoglutarat dehidrogenazei (fig. 2.87).

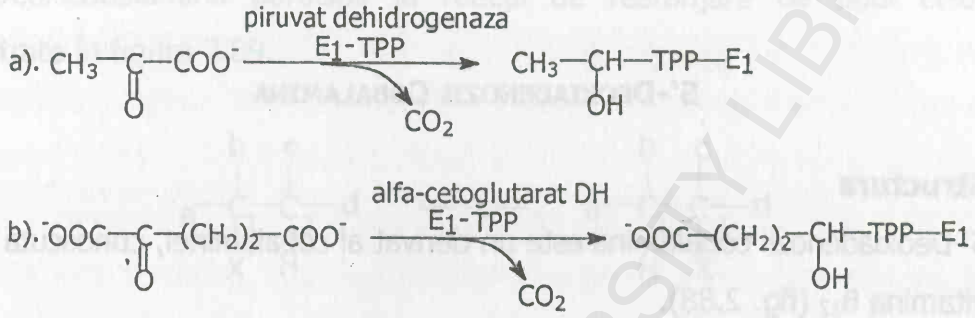


FIGURA 2.87.
Reacţiile catalizate de E_1-TPP din complexul:
a) Piruvat dehidrogenazei
b) A-cetoglutarat dehidrogenazei

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COFACTORI IMPLICAŢI ÎN REARANJAREA SUBSTITUENŢILOR ATOMILOR DE CARBON ADIACENŢI

5′-Deoxiadenozil cobalamina
Enzime dependente de 5′-deoxiadenozil cobalamina

5′-DEOXIADENOZIL COBALAMINA

Structura

5′-Deoxiadenozil cobalamina este un derivat al cobalaminei, cunoscută ca vitamina B_{12} (fig. 2.88).

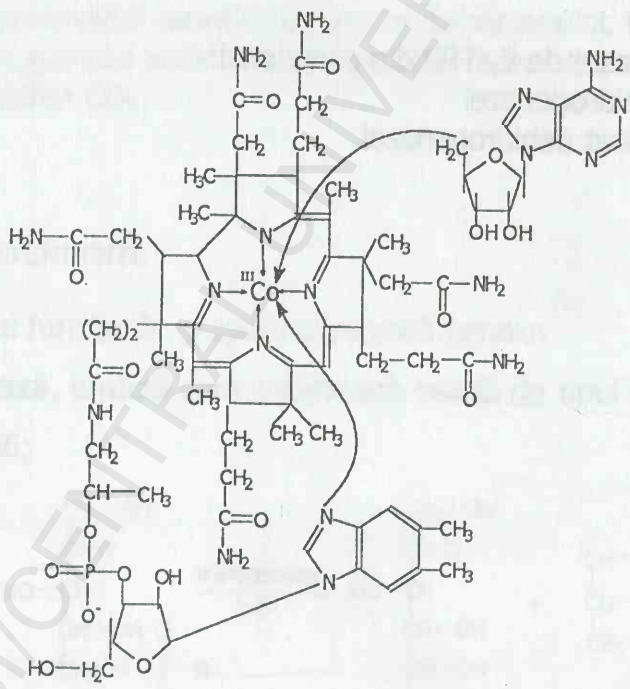


FIGURA 2.88.
Structura 5′-deoxiadenozil cobalaminei
Cobaltul trivalent, din inelul corinic al cobalaminei, este hexacoordinat; cea de-a 6-a legătură, *de tip covalent*, este realizată cu 5′-deoxi-adenozina.

BCU "ASVICENTRAL" UNIVERSITY LIBRARY

Sinteza

5'-Deoxiadenozil cobalamina se sintetizează din cobalamină, probabil prin "adenozilare" catalizată de o transferază specifică ATP-dependentă.

Rolul biologic

5'-Deoxicobalamina participă la reacţii de rearanjare de tipul celei ilustrate în figura 2.89.

FIGURA 2.89.
Reacţie de rearanjare, la atomi de carbon adiacenţi, catalizată de enzime dependente de 5'-deoxiadenozil cobalamină

ENZIME DEPENDENTE DE 5'-DEOXIADENOZIL COBALAMINĂ

Din această categorie fac parte:

- ✓ **metilmaloni-CoA mutaza;**
- ✓ **glutamat mutaza**

Aceste enzime catalizează reacţiile prezentate în figura 2.90.

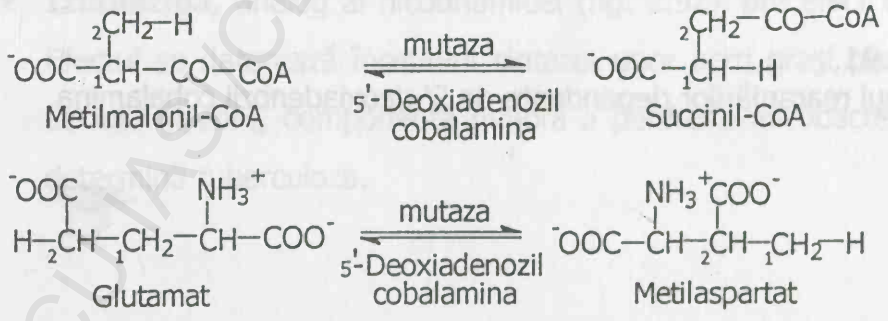


FIGURA 2.90
Mutaze dependente de 5'-deoxiadenozil cobalamină;

Pentru a înţelege rolul 5′-deoxiadenozil cobalaminei în aceste reacţii, trebuie menţionat faptul că legătura dintre cobaltul trivalent şi carbonul din poziţia 5′ a deoxiadenozinei este o legătură covalentă suficient de slabă pentru a putea fi desfăcută ca rezultat al tensiunilor induse de numeroasele interacţiuni stabilite între radicalii din centrul activ al apoenzimei şi cofactor. Ca rezultat al clivării homolitice a acestei legături rezultă radicalul 5′-deoxiadenozinil şi cobaltul devine bivalent. Radicalul extrage un atom de hidrogen de la C_2 al substratului şi astfel generează un alt radical care, după ce suferă procesul de rearanjare, îşi ia înapoi atomul de hidrogen împrumutat 5′-deoxiadenozinei şi formează produsul final (fig. 2.91).

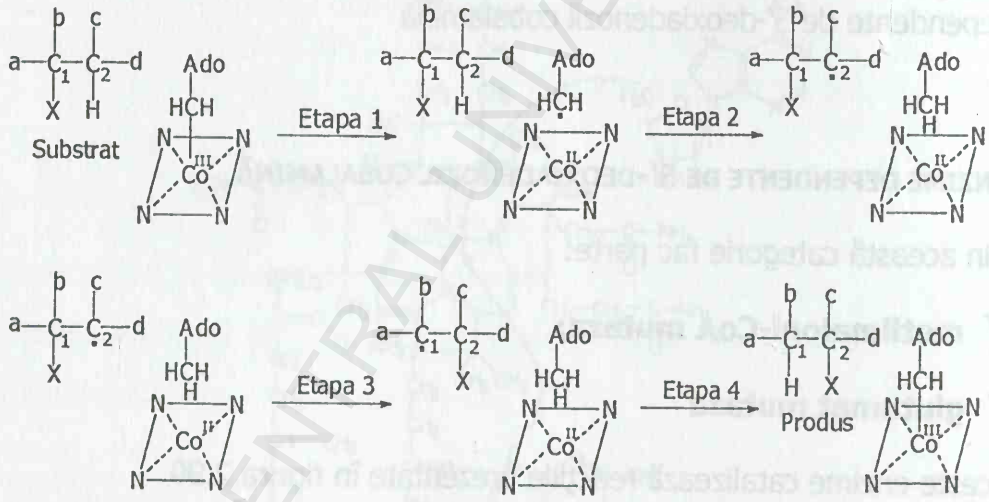


FIGURA 2.91.
Mecanismul rearanjărilor dependente de 5′-deoxiadenozil cobalamina.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANALOGI AI UNOR COFACTORI ORGANICI UTILIZAŢI CA MEDICAMENTE

- ✓ **Sulfanilamida,** analog al acidului p-aminobenzoic (fig. 2.92), are efect bacteriostatic, previne dezvoltarea microorganismelor patogene. Acest efect se datorează inhibiţiei sintezei bacteriene a acidului folic, consecutiv a acidului tetrahidrofolic (cofactor esenţial pentru sinteza nucleotidelor şi a acizilor nucleici).
- ✓ **Metotrexatul,** analog al acidului folic (fig. 2.92), este agent oncostatic utilizat pentru tratarea leucemiei, a formelor severe de psoriazis, etc. Efectul său se datorează inhibiţiei dihidrofolat reductazei, enzimă implicată în refacerea acidului tetrahidrofolic din acid dihidrofolic. Consecutiv este împiedicată sinteza acizilor nucleici şi diviziunea celulară. Sunt afectate mai ales celulele canceroase, dar şi celulele din măduva osoasă şi intestin (care se divid rapid).
- ✓ **Dicumarolul şi warfarina,** analogi ai vitaminei K (fig. 2.92), sunt agenţi anticoagulanţi. Efectul lor se datorează inhibării reductazelor implicate în regenerarea formei hidrochinonice a vitaminei K, indispensabilă γ-carboxilazei. Consecutiv este prevenită activarea factorilor implicaţi în cascada coagulării.
- ✓ **Izoniazida,** analog al nicotinamidei (fig. 2.92), are efect bactericid. Efectul se datorează încetinirii sintezei unor acizi graşi precursori ai acidului micolic, componentă majoră a peretelui micobacteriilor care determină tuberculoza.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

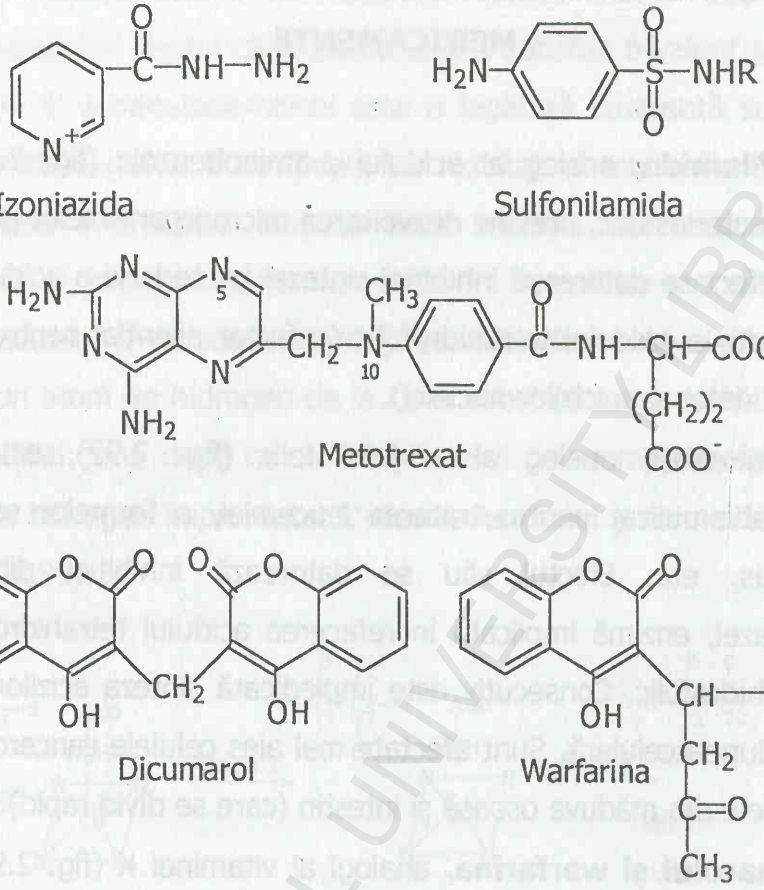


FIGURA 2.92.
Structura unor analogi ai nicotinamidei (izoniazida), acidului p-aminobenzoic (sulfonilamida), acidului folic (metotrexat), vitaminei K (dicumarol, warfarină).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VITAMINE
Definiţie
Caracteristici comune
Criterii de clasificare

Definiţie

Din punct de vedere:

- **structural** vitaminle sunt o clasă heterogenă de compuşi organici micromoleculari;
- **al rolului biologic** vitaminle sunt compuşi absolut necesari pentru desfăşurarea normală a funcţiilor celulare specifice, respectiv pentru menţinerea stării de sănătate.

Caracteristici comune

Vitaminele au următoarele caracteristici:

- în general nu pot fi sintetizate de organismul uman, deci trebuie să fie preluate din alimente;
- în condiţii normale sunt necesare în cantităţi mici (2µg-60mg/zi);
- în anumite condiţii fiziologice sau patologice: gestaţie, lactaţie, dietă hipocalorică, strict vegetariană, sindrom de malabsorbţie, alcoolism, disbioză, etc. sunt necesare în cantitate crescută.

Criterii de clasificare

Vitaminele se pot clasifica în funcţie de:

- solubilitatea în apă, respectiv în lipide (fig. 3.1);
- apartenenţa la "complexul-B", în cazul vitaminelor hidrosolubile;
- funcţia biologică, în cazul vitaminelor hidrosolubile din complexul-B.

BCU IAŞI "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

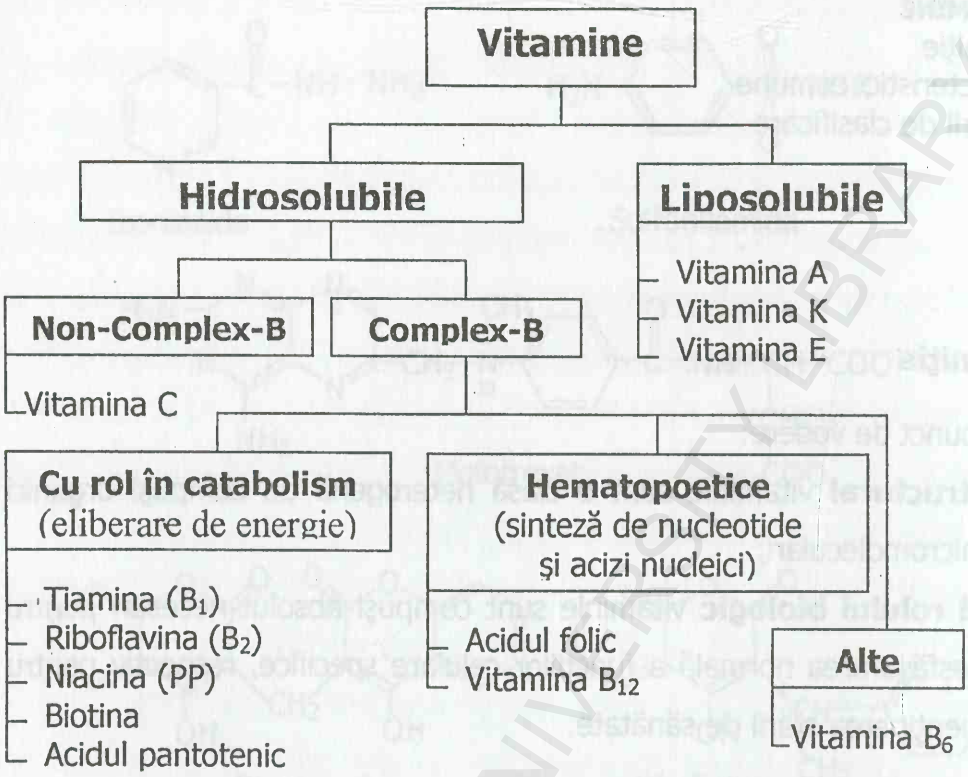


FIGURA 3.1. Clasificarea vitaminelor

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VITAMINE HIDROSOLUBILE
Caracteristici comune
Clasificare &Rol biologic.
Semnificaţii clinice

Caracteristici comune

Vitaminele hidrosolubile au următoarele caracteristici:

- în vederea absorbţiei intestinale unele necesită factori proteici (ex. pentru vit. B_{12} este necesar factorul intrinsec, iar pentru acidul folic conjugaza);
- nu se depozitează (excepţie acidul folic şi vitamina B_{12} care pot fi depozitate, în cantităţi mici, în ficat);
- sunt obligatorii în dieta zilnică deşi unele pot fi sintetizate, în cantitate limitată, de flora microbiană intestinală (biotina, acidul folic), respectiv de hepatocite (vitamina PP);
- necesarul zilnic variază între 2µg - 60mg;
- sunt excretate în urină când nivelul lor plasmatic depăşeşte pragul renal;
- sunt precursori ai unor coenzime şi grupări prostetice necesare enzimelor implicate în căile catabolice, producătoare de energie, sau în căile de biosinteză a nucleotidelor, respectiv eritropoeză (vezi tabel 1 şi 2).
- deficitul lor (hipovitaminoza) determină apariţia unor boli ale căror simptome nespecifice sunt: dermatita, glosita (inflamaţia şi înroşirea limbii, atrofierea papilelor), cheilita (inflamaţia acută sau cronică a mucoasei buzelor), diarea, neuropatia periferică, depresia, confuzia, pierderea capacitătii de coordonare a mişcărilor (tabel 3.1 şi 3.2).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Clasificare & Rol biologic

Vitaminele hidrosolubile se pot clasifica, în funcţie de rolul cofactorilor enzimatici derivaţi, în vitamine:

- ✓ implicate în producerea energiei (tabel 3.1);
- ✓ implicate în eritropoeză (tabel 3.2)
- ✓ implicate în alte procese (tabel 3.2)

Aceste vitamine au rolul de cofactori organici sau de precursori ai acestora (vezi partea a 2-a şi tabelul 1)

Tabel 3.1. Vitamine hidrosolubile implicate în producerea energiei

Vitamina	Cofactor derivat	Rol biologic	Surse	Necesar per zi	Patologie asociată hipovitaminozei
B_1 Tiamina	**TPP**	În reacţii de clivare a legăturilor C-C şi C-X	Cereale nedecorticate, legume, carne de porc	1-2mg	Beri-beri Wernicke-Korsakoff
B_2 Riboflavina	**FMN/$FMNH_2$ FAD/$FADH_2$**	În reacţii de transfer de $e^- + H^+$	Spanac, lapte, ouă, ficat	1-2mg	Dermatită Cheilită Glosită
PP Niacina	**NAD^+/NADH $NADP^+$/NADPH**	În reacţii de transfer de $e^- + H^+$	Cereale, lapte, ficat	19mg	Pelagra (boala celor 3D)
Biotina	**N-carboxibiotina** (Biocitină)	În reacţii de transfer a CO_2 (carboxilare)	Ouă (gălbenuş), lapte, ficat	-	-
Acidul pantotenic	**Coenzima A (CoA) Fosfopanteteina**	În reacţii de transfer a grupărilor acil	Ouă, ficat, droidie de bere	10mg	-

ROLAND CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 3.2. Vitamine hidrosolubile implicate în eritropoeză şi în alte procese

Vitamina	Coenzima	Rol biologic	Surse	Necesar per zi	Patologie asociată
Acid folic	**Acid tetrahidrofolic (H_4F)**	În reacţii de transfer a grupărilor: $-CH_3$, $-CH_2-$, $=CH-$, $-CH=O$	Legume cu frunze verzi, mazăre, cereale, ficat	200µg	Anemie megaloblastică macrocitară
B_{12} Cobalamină	**Metilcobalamină** **5`-Deoxiadenozil cobalamină**	În reacţia de metilare a homocisteinei În reacţii de rearanjare a atomilor de C adiacenţi	Carne, ficat, lapte	2µg	Anemie pernicioasă Neuropatie periferică
B_6	**Piridoxalfosfat (PALPO)**	În reacţii de transaminare, dezaminare, decarboxilare, condensare a aminoacizilor	Ficat, muşchi, ou (gălbenuş), cereale	1-2mg	Anemie
C Acid ascorbic	-	În reacţii de transfer de $e^- + H^+$	Citrice, roşii, legume cu frunze verzi	60mg	Scorbut

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

Semnificaţii clinice

Scăderea concentraţiei unei vitamine sub nivelul minim necesar menţinerii stării de sănătate (hipovitaminoza) determină apariţiei semnelor caracteristice unei boli. Hipovitaminoza poate fi cauzată de:

- aportul alimentar insuficient;
- absorbţia deficitară, respectiv lipsa factorilor proteici (factorul intrinsec necesar pentru B_{12}, şi conjugaza necesară pentru acidul folic);
- utilizarea deficitară, respectiv lipsa proteinelor transportor (pentru B_{12}), a enzimelor de conversie în cofactori enzimatici;
- reducerea sintezei din cauza disbiozei (în cazul biotinei, acidului folic) sau a lipsei precursorilor (ex.Trp în cazul vit.PP);
- necesarul crescut (graviditate, lactaţie, convalescenţă);
- excreţia excesivă (afecţiuni renale);
- inactivare prin reacţia cu un medicament sau metabolit (ex. izoniazida şi aldehida acetică în cazul vit. B_6);
- creşterea concentraţiei enzimelor dependente (de coenzimele derivate) indusă de unele medicamente (ex. anticoncepţionalele orale în cazul enzimelor PALPO dependente).

✓ **Hipovitaminoza B_1 - Boala beriberi**

Hipovitaminoza B_1, datorată regimului alimentar sărac în vitamină (ex. orez decorticat), determină scăderea nivelului tiamin pirofosfatului (TPP) şi astfel, conduce la reducerea activităţii piruvat- şi α-cetoglutarat-dehidrogenazelor, precum şi a transcetolazei. Ca urmare, este compromis atât catabolismul glucidic, (respectiv generarea energiei), cât şi formarea ribozei şi a NADPH necesare sintezei nucleotidelor şi a acizilor graşi. Cel mai afectat este sistemul

nervos, sistem în care TPP este implicat şi în transmisia influxului nervos. Simptomelor primare (observate mai ales la bătrâni): depresie, neuropatie periferică, iritabilitate, li se adugă (în deficienţa severă) simptomele sindromului Wernicke-Korsakoff: ataxie (dereglarea coordonării mişcărilor), oftalmoplegie (pierderea coordonării ochilor), şi simptomele bolii Beriberi: atrofierea şi slăbirea muşchilor, cardiomiopatie cu sau fără edem (beriberi uscat, respectiv umed). De precizat că un consum excesiv de glucide, ceai, cafea (care conţin substanţe ce distrug tiamina) necesită un aport suplimentar de vitamină B_1!

✓ **Hipovitaminoza PP - Pelagra (sau maladia celor 3 D)**

Hipovitaminoza PP se datorează absorbţiei deficitare (boala Hartnup), regimului alimentar sărac în triptofan (ex. porumb) sau în vitamină B_6 (precursorul PALPO) necesară conversiei hepatice a Trp în nicotinamidă. Deficitul de vitamină PP determină scăderea nivelului coenzimelor derivate (NAD^+, $NADP^+$) şi inactivarea dehidrogenazelor $NAD(P)^+$-dependente implicate în căile catabolice, producătoare de energie. Cel mai afectat va fi sistemul nervos (**d**ementă). Alte simptome ale hipovitaminozei PP sunt **d**iarea (inflamaţia cronică a mucoasei intestinale), pielea aspră (pellagra) şi **d**ermatita consecutivă expunerii la soare.

✓ **Hipovitaminoza C - Scorbut**

Hipovitaminoza C poate fi rezultatul unui aport alimentar insuficient sau al unui stress. Lipsa vitaminei C afectează absorbţia Fe, conversia folatului în tetrahidrofolat, funcţia hidroxilazelor implicate în sinteza colagenului, adrenalinei şi a corticosteroizilor (hormoni antistress). În plus, vitaminele A şi E vor fi expuse acţiunii oxidante

a ROS. Ca urmare a reducerii nivelului Fe, H_4F, hormonilor antistress şi a vitaminelor (A, E) apar semnele anemiei şi susceptibilitatea crescută la infecţii. Pe de altă parte, colagenul sintetizat va fi instabil; acest fapt va afecta ţesutul conjunctiv, bogat în colagen, din pereţii vasculari, piele, oase, şi determina apariţia semnelor clinice caracteristice scorbutului: fragilitate capilară (hemoragii punctiforme în piele), alterarea gingiilor, rezistenţă scăzută la efort, osteoporoză.

De remarcat că fumatul, contraceptivele orale, corticosteroizii reduc nivelul seric al vitaminei C, iar aspirina blochează preluarea acidului ascorbic de către leucocite.

Megadozele de vitamina C nu previn răceala, doar ameliorează simptomele (probabil datorită stimulării leucocitelor precum şi a sintezei şi secreţiei de histamină).

✓ **Hipovitaminoza corespunzătoare acidului folic - Anemia megaloblastică macrocitară**

Deficitul real de acid folic poate fi determinat de o dietă neadecvată, de malabsorbţie (lipsa conjugazei, enzima care converteşte poliglutamatul în monoglutamat), sau de reducerea sintezei în lumenul intestinal (disbioză). Deficitul aparent (consecutiv acumulării de CH_3-H_4F, sau H_2F) se datorează deficitului de vitamină B_{12}, sau inhibiţiei cu medicamente (ex. methotrexat) a dihidrofolat reductazei. Hipovitaminoza, reală sau aparentă, afectează sinteza nucleotidelor şi, implicit şi pe aceea a acizilor nucleici. Ca urmare, scade numărul hematiilor (anemie) şi, în schimb, în sânge apar forme primitive de globule roşii, de dimensiuni mari (megaloblaste), bogate în hemoglobină, intens colorate (macrocitare).

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

✓ **Hipovitaminoza B_{12} - Anemia perniciosă (anemia Biermer)**

Hipovitaminoza B_{12} se datorează absorbţiei deficitare cauzată, la rândul ei, de secreţia neadecvată a factorului intrinsec, o glicoproteină secretată de mucoasa gastrică (celula parietală) care, în lumenul intestinal, complexează cobalamina în vederea absorbţiei. Hiposecreţia factorului intrinsec se datorează fie unei gastrite atrofice, fie unei atrofii gastrice. Deficitul de B_{12} din organismul uman va afecta activitatea enzimelor dependente de 5'-deoxicobalamină (metilmalonil-CoA mutaza) şi metil-cobalamină (metil transferaza). Acumularea metilmalonil-CoA, inhibitor competitiv al palmitat sintetazei, va afecta sinteza acizilor graşi şi astfel, va conduce la degenerarea tecii de mielină, respectiv apariţia simptomelor neurologice (neuropatie periferică). În plus, datorită deficienţei secundare de acid tetrahidrofolic (blocat sub forma de CH_3-H_4F) apare anemia (numită pernicioasă) cu simptome caracteristice anemiei megaloblastice macrocitare.

De remarcat că acumularea de acid metilmalonic, cu scăderea consecutivă a pH-ului sângelui şi urinei (acidurie metilmalonică), poate fi determinată şi de deficienţa enzimei care transformă cobalamina în 5'-deoxiadenozil cobalamina.

✓ **Hipovitaminoză generalizată - Alcoolism**

Consumul excesiv de alcool determină:

- o alimentaţie unilaterală, săracă în vitamine;
- alterarea mucoasei tractului gastro-intestinal şi consecutiv, reducerea absorbţiei acidului folic şi a vitaminelor B_1, B_{12};

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 3.3. Vitamine liposolubile

Vitamina	Forme	Funcţia biologică	Surse	Necesar per zi	Patologie asociată
A	β-Caroten Retinol Retinal Acid retinoic	Provitamină, antioxidant Precursor al retinol fosfatului Precursor al 11-cis-retinalului Hormon	Ficat, unt, ou (gălbenuş), legume verzi şi galbene	6mg 1mg - -	Hemeralopie Xeroftalmie Orbire Infecţii Sterilitate
K	Filokinonă Menakinonă Menadiona	Coenzimă a γ-glutamat carboxilazei	Ficat, ou (gălbenuş), spanac, varză, flora intestinală	80μg	Coagulare deficitară
E	Tocoferoli α, β, etc.	Antioxidant	Ulei vegetal, ou, ficat	10mg	Anemie hemolitică

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VITAMINE LIPOSOLUBILE

Caracteristici generale

Vitamina A

- Structura
- Absorbţia şi metabolismul
- Rolul biologic
- Semnificaţii clinice

Vitamina E

- Structura
- Absorbţia
- Rolul biologic
- Semnificaţii clinice

(Vitamina K-vezi cofactori organici)

Caracteristici generale

Vitaminele liposolubile, prezentate în tabelul 3.3, au următoarele caracteristici:

- sunt eliberate din alimente, absorbite în sânge şi transportate sub formă de chilomicroni împreună cu celelalte lipide exogene;
- se depozitează (în cantităţi limitate) în ficat şi ţesutul adipos;
- în cazul vitaminei A excesul este toxic;
- cu excepţia vitaminei K nu sunt precursori ai unor coenzime sau grupări prostetice.
- scăderea concentraţiei lor, sub nivelul minim necesar menţinerii stării de sănătate (hipovitaminoza), determină apariţia unor boli caracteristice (vezi tabel 3.3)
- hipovitaminoza poate fi cauzată de: aportul alimentar insuficient, malabsorbţie, disbioză (în cazul vitaminei K), anumite condiţii patologice care conduc la intensificarea stressului oxidativ (în cazul vitaminei E).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina A

Structura

În organismul uman vitamina A există sub formă de retinol, retinal şi acid retinoic (fig 3.2):

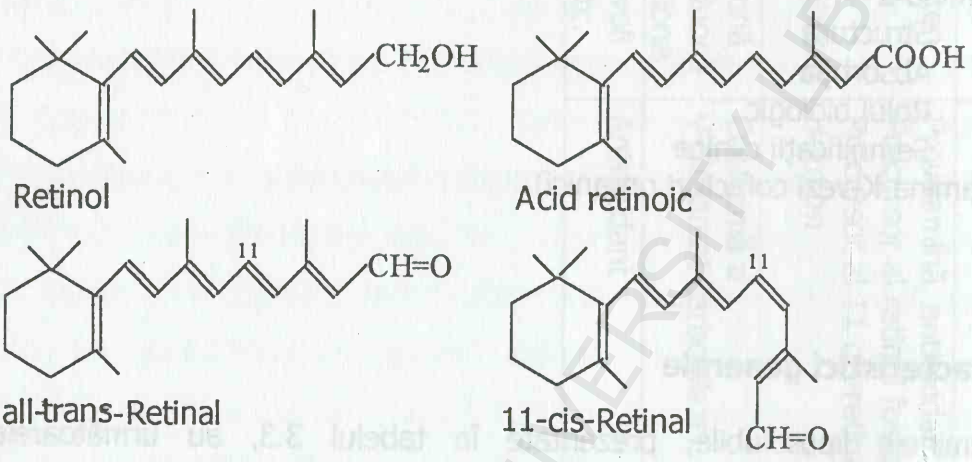


FIGURA 3.2. Structura celor trei stări de oxidare ale vitaminei A

Absorbţia şi metabolismul

În alimentele de origine vegetală se găsesc precursori ai vitaminei A (caroteni), în special β caroten (fig. 3.3). În alimentele de origine animală se găseşte mai ales retinol esterificat cu acizi graşi.

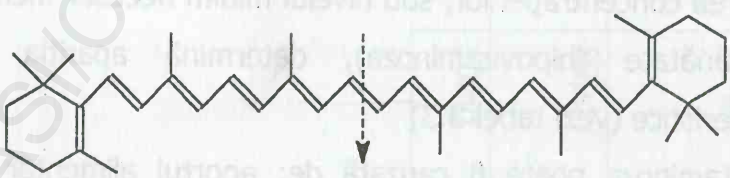


FIGURA 3.3.
Structura β carotenului
(săgeata indică legătura care urmează a fi scindată pentru formarea a 2 molecule de retinal)

UMF IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Digestia, similară altor lipide, conduce la eliberarea retinolului din retinil esteri. După absorbţie, cea mai mare parte a β-carotenului este convertită în 2 molecule de retinal care apoi sunt transformate în retinol. Retinolul este apoi esterificat cu acidul palmitic, formă sub care intră în compoziţia chilomicronilor şi este transportat către ficat unde se depozitează. La nevoie, esterul este hidrolizat, iar retinolul eliberat în sânge este preluat de către un transportor specific, de natură proteică.

Rolul biologic

Datorită faptului că există în mai multe forme, vitamina A poate îndeplini o varietate de roluri, care vor fi prezentate în cele ce urmează.

Rolul β-carotenului

Datorită caracterului său antioxidant, β-carotenul are rolul de a descompune radicalii lipoperoxizidici (fig. 3.4) formaţi prin acţiunea speciilor reactive ale oxigenului asupra lipoproteinelor membranare.

Acţionând la presiune scăzută a oxigenului, contribuie alături de vitamina E, la prevenirea cancerului.

Rolul retinolului

Sub formă de retinol-fosfat, retinolul este esenţial (ca transportor) pentru sinteza glicoproteinelor şi a mucopolizaharidelor, compuşi care intră în compoziţia mucusului secretat de ţesutul epitelial.

Rolul 11-cis-retinalului

Obţinut, în retină, prin transformarea enzimatică a retinolului, 11-cis-retinalul se leagă de opsină şi formează împreună rodopsina, o proteină integrală, cu rol de fotoreceptor, din membranele discurilor existente în celulele bastonaş (fig. 3.5 şi 3.6).

BCU "ASTRA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

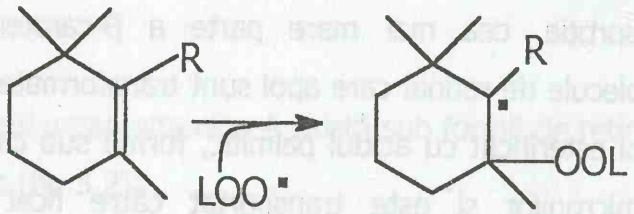


FIGURA 3.4.
Rolul antioxidant al β-carotenului
(LOO· = radical lipoperoxidic)

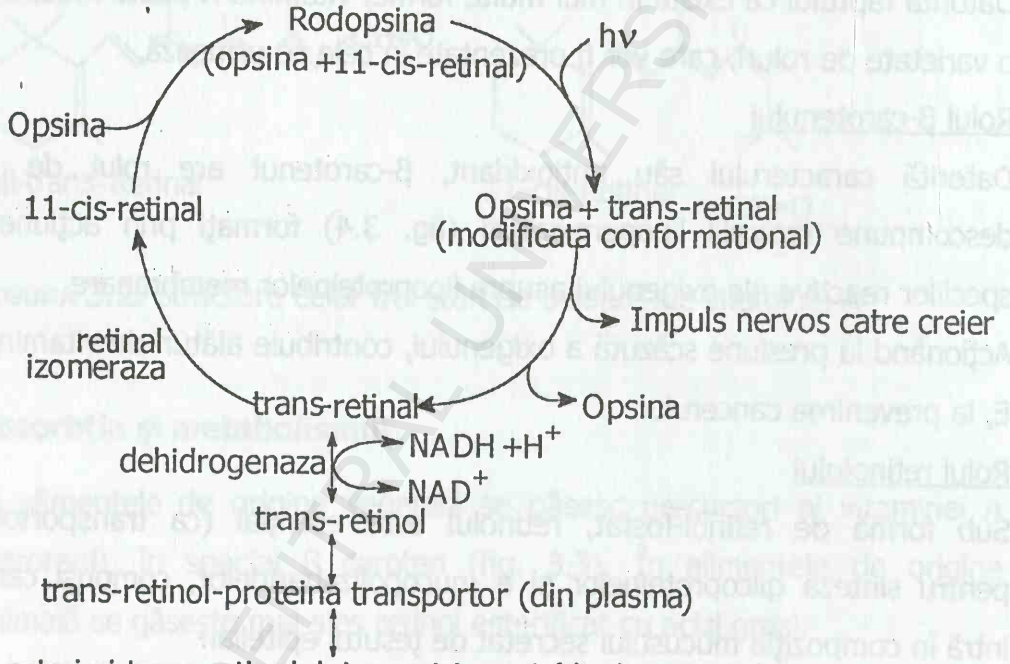


FIGURA 3.5.
Rolul vitaminei A în procesul vederii

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

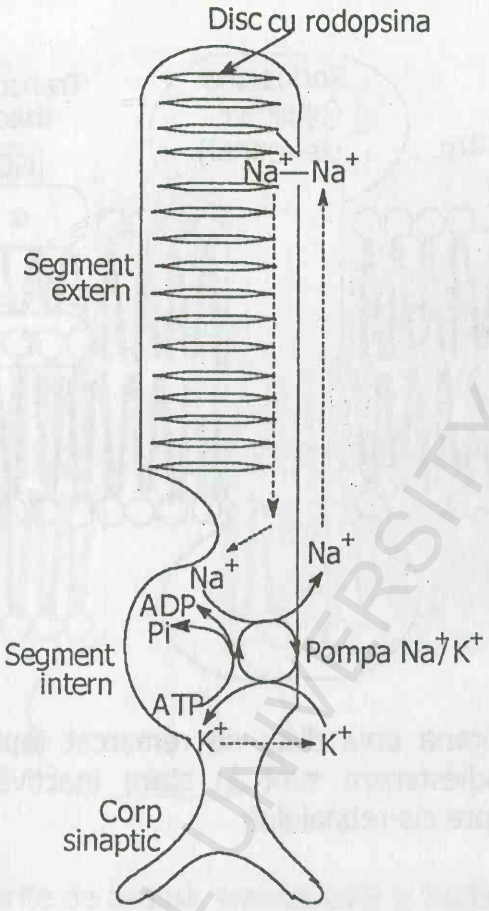


FIGURA 3.6.
Celula bastonaş din retină

Pe lângă rodopsină, în membranele discurilor există şi alte proteine implicate în mecanismul vederii: transducina (o proteină G) şi fosfodiesteraza (fig. 3.7).

În absenţa luminii aceste proteine sunt inactive. Prin interacţiunea unui foton cu rodopsina are loc transformarea 11-cis-retinalului în all-trans-retinal (fig. 3.8) ceea ce determină modificarea conformaţională a opsinei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

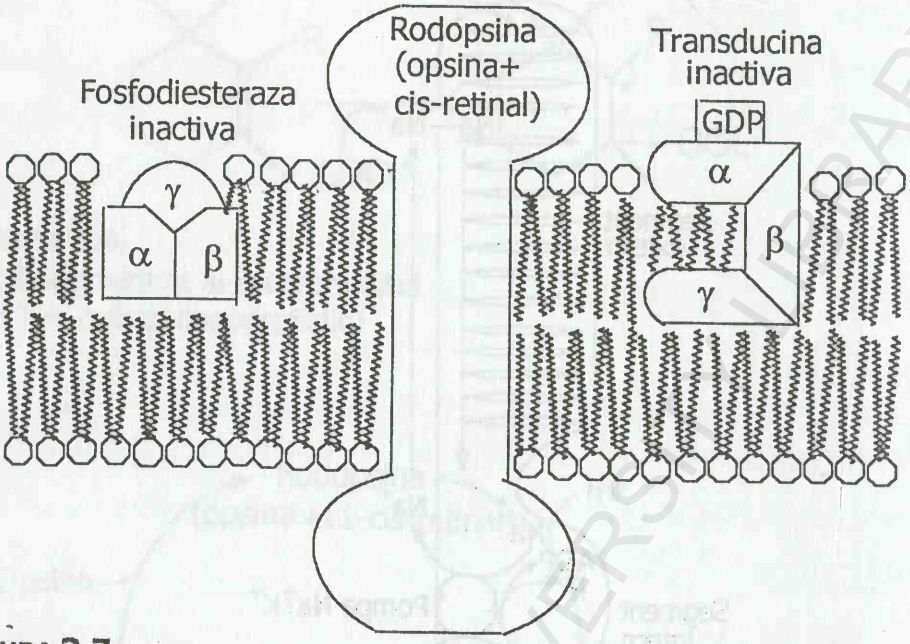


FIGURA 3.7.
Fragment din membrana unui disc; de remarcat faptul că rodopsina, transducina şi fosfodiesteraza sunt în stare inactivă, premergătoare acţiunii fotonului asupra cis-retinalului

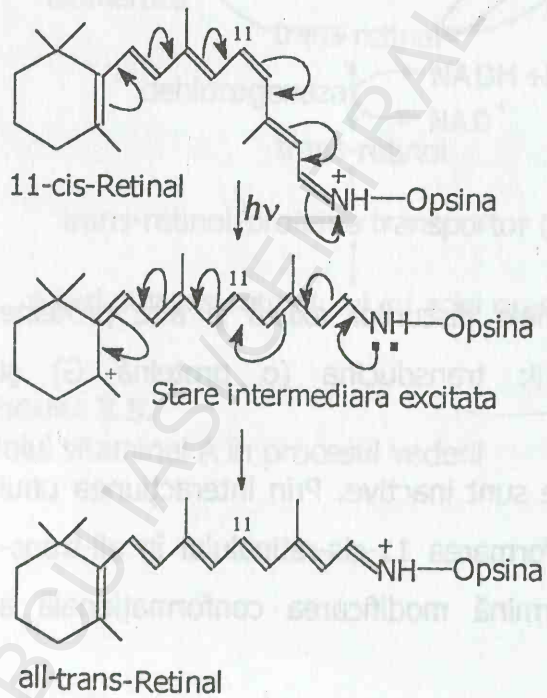


FIGURA 3.8.
Efectul fotonului asupra 11-cis-retinalului;
De remarcat că izomerizarea 11-cis la 11-trans este posibilă numai după deplasarea electronilor π către nucleu şi transformarea legăturii duble $C_{11}=C_{12}$ în legătură simplă C_{11}-C_{12} care permite rotaţia liberă.

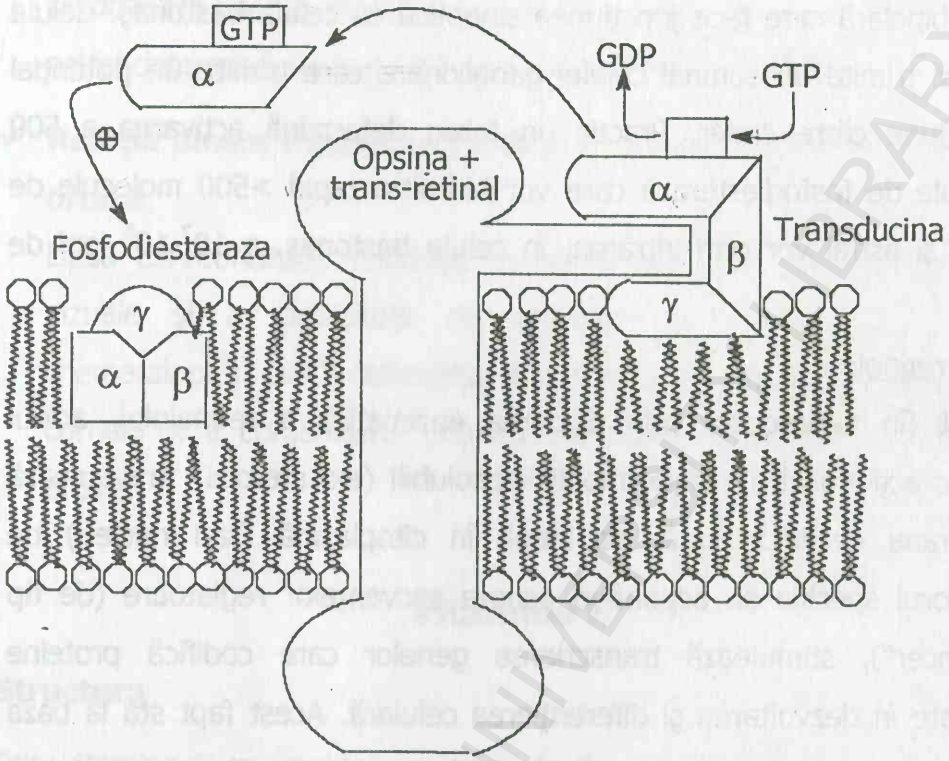


FIGURA 3.9.
Transformările suferite de opsină, transducină şi fosfodiesterază ca urmare a izomerizării retinalului

Această modificare conformaţională favorizează interacţiunea opsinei cu transducina (fig. 3.9). Ca urmare, la nivelul subunităţii alfa a transducinei se produce schimbul GDP cu GTP. Această schimbare va determina eliberarea subunităţii alfa-GTP care va acţiona ca activator al fosfodiesterazei. Activarea fosfodiesterazei, sinonimă cu desprinderea subunităţii reglatoare γ, va avea ca efect hidroliza moleculelor de cGMP din citosolul celulelor bastonaş. Ca urmare, se închid canalele de Na^+ (şi Ca^{2+}) din segmentul extern şi, datorită acumulării ionilor Na^+ pe faţa externă a membranei celulare, se produce hiperpolarizarea acesteia ($\Delta V \approx 1mV$).

BCU "ASACHI" IAŞI LIBRARY

Semnalul electric va fi transmis corpului sinaptic de unde va fi preluat de celula bipolară care face joncţiunea sinaptică cu celula bastonaş. Celula bipolară trimite un semnal celulei ganglionare care trimite un potenţial de acţiune către creier. Practic un foton determină activarea a 500 molecule de fosfodiesterază care vor hidroliza rapid >500 molecule de cGMP, şi astfel vor opri intrarea, în celula bastonaş, a 10^7-10^8 ioni de Na^+.

Acidul retinoic

Format (în hepatocite) prin oxidarea enzimatică a retinalului, acidul retinoic acţionează ca şi hormonii liposolubili (ex. steroizi): traversează membrana celulelor ţintă, se leagă în citoplasmă (sau nucleu) de receptorul specific şi, acţionând asupra secvenţelor reglatoare (de tip "enhancer"), stimulează transcrierea genelor care codifică proteine implicate în dezvoltarea şi diferenţierea celulară. Acest fapt stă la baza utilizării preparatelor care conţin analogi ai acidului retinoic (ex. acidul 13-cis-retinoic) la tratarea acneei şi a psoriazisului.

Semnificaţii clinice

Scăderea rezervelor de vitamină A se datorează aportului insuficient şi/sau maldigestiei lipidice.

Datorită variatelor roluri ale celor trei stări ale vitaminei, hipovitaminoza poate determina, în funcţie de gravitatea ei, scăderea rezistenţei organismului la infecţii, scăderea acuităţii vizuale, orbire, şi sterilitate.

✓ **Relaţia dintre hipovitaminoza A şi susceptibilitatea crescută pentru infecţii**

Lipsa retinolului determină, pe de-o parte, limitarea secreţiilor mucoase (lipsa glicoproteinelor şi a mucopolizaharidelor) şi, pe de altă parte, exacerbarea sintezei keratinei. Keratinizarea celulelor

mucoasei tractului respirator, gastro-intestinal, genito-urinar, favorizează apariţia fisurilor, adevărate porţi de intrare a microbilor, şi astfel determină susceptibilitatea crescută pentru infecţii.

✓ **Relaţia dintre hipovitaminoza A şi hemeralopie, xeroftalmie, orbire**

Lipsa cis-retinalului, conduce în prima etapă la scăderea acuităţii vizuale şi a capacităţii de adaptare la lumina crepusculară (hemeralopie). Dacă deficienţa este severă se produce keratinizarea corneei şi a conjunctivei (xeroftalmie) care poate duce în final la orbire.

Vitamina E

Structura

Prin vitamina E se înţelege un grup de 6 tocoferoli (α, β, γ, etc.) care sunt derivaţi mono, di sau trimetilaţi (în poziţiile 5,7,8) ai tocolului (derivat poliizoprenic al cromanului). Cel mai important, ca pondere, este α-tocoferolul (fig. 3.10)

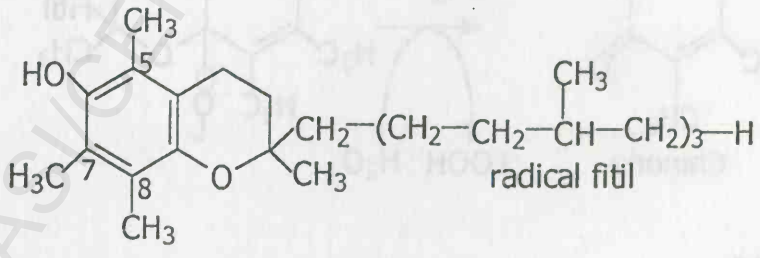


FIGURA 3.10. Structura α-tocoferolului

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Absorbţia

Vitamina A, este absorbită de mucoasa intestinală împreună cu alte lipide şi apoi este transportată, sub formă de chilomicroni, la ficat. Apoi, sub formă de VLDL este transportată către ţesuturile extrahepatice unde fie se depozitează (ţesut adipos), fie intră în compoziţia membranelor.

Rolul biologic

Datorită caracteristicilor structurale are rol antioxidant, scurtează viaţa radicalilor lipoperoxidici formaţi prin acţiunea oxigenului asupra acizilor graşi polinesaturaţi din fosfolipidele membranare (fig. 3.11).

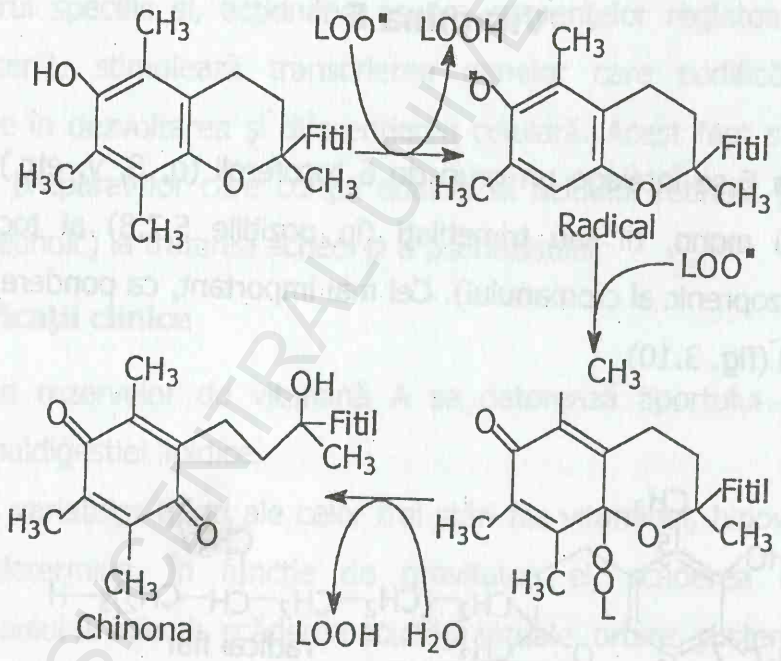


FIGURA 3.11.
Rolul antioxidant al vitaminei E
De remarcat faptul că vitamina E este degradată ireversibil, deci estescoasă din circulaţie

BCU MASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu alte cuvinte, vitamina E protejează membranele de acţiunea nocivă a oxigenului şi a speciilor sale reactive (vezi anexa).

În plus, are rolul de a proteja & stabiliza coenzima Q şi de a intensifica sinteza hemului.

Semnificaţii clinice

Hipovitaminoza E poate fi determinată de aportul insuficient, malabsorbţia lipidică, sau de anumite condiţii patologice care conduc la intensificarea stressului oxidativ (consum excesiv de vitamină E).

✓ **Relaţia dintre hipovitaminoza E şi anemia hemolitică**

Reducerea depozitelor de vitamină E este sinonimă cu reducerea eficienţei îndepărtării lipoperoxizilor, respectiv cu alterarea fosfolipidelor membranare, inclusiv a celor din membranele eritrocitare. Ca urmare eritrocitele devin fragile, sunt lizate în curentul circulator. Pentru că hipovitaminoza E afectează şi sinteza hemului, scade numărul hematiilor din sânge, deci se instalează anemia hemolitică.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 1. Necesităţile zilnice de minerale şi vitamine

Minerale		Vitamine	
Ca	800-1200 mg	**Vitamina C**	50-60 mg
Mg	300-450 mg	**Vitamina PP**	15-20 mg
Zn	12-15 mg	**Vitamina B_6**	1,5-2 mg
Fe	10-15 mg	**Vitamina B_2**	1,2-1,8 mg
Cu	1,5-3 mg	**Vitamina B_1**	1-1,5 mg
Cr	50—200 µg	**Acid folic**	150-200 µg
Se	50-75 µg	**Vitamina B_{12}**	2 µg
Co	<50	**Vitamina E**	8-10 mg
Mo	<50	**Vitamina A**	800-1000 µg
		Vitamina K	45-65 µg

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

10000 lei

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973 - 8019 - 91 - 5